

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 895**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/22** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 15/90** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2019 PCT/US2019/065129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2020 WO20123327**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2019 E 19832777 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 3894549**

54 Título: **Transposasa piggyBac mutada**

30 Prioridad:

**10.12.2018 US 201862777325 P**

**24.10.2019 US 201962925516 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.12.2024**

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)**

**One Amgen Center Drive**

**Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**AGRAWAL, NEERAJ J.;**

**DARIS, KRISTINE M.;**

**STEVENS, JENNITTE L.;**

**LE, HUONG THI NGOC y**

**TALAVAN, NOELIA BLANCO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 991 895 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Transposasa piggyBac mutada

## CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a transposasas piggyBac modificadas genéticamente para aumentar la estabilidad en una célula y el uso de transposasas piggyBac modificadas genéticamente para transfectar células de forma estable, desarrollo de líneas celulares, modificación de genoma, y mejora del título de proteínas recombinantes, entre otros usos.

## ANTECEDENTES

10 Debido a sus amplias aplicaciones, las sustancias biológicas se utilizan en todo el planeta en una gran variedad de aplicaciones, tales como terapéuticas y diagnósticas. En la actualidad, aproximadamente el 51% de sustancias biológicas se producen usando células de mamífero, siendo las células de ovario de hámster chino (CHO) la factoría celular predominante (Zhou y Kantardjeff, *Mammalian cell cultures for biologics manufacturing*, Springer, Heidelberg, Nueva York, 2014. Como resultado, la industria biofarmacéutica está experimentando un rápido cambio de paradigma. La velocidad hasta la comercialización y la economía de costes son ahora más importantes que nunca. Los elevados  
15 costes de I+D y de tiempos de desarrollo de los fármacos biofarmacéuticos han obligado a eliminar retrasos e ineficacias en el desarrollo de fármacos y, de manera más importante, en la fabricación. Al mismo tiempo, las carteras de productos tienen cada vez mayor complejidad y diversidad, las empresas biofarmacéuticas necesitan ahora infraestructuras que puedan adaptarse a múltiples modalidades con demandas variables, que van desde terapias personalizadas derivadas de células de donante a la producción de fármacos biológicos en cantidades comprendidas de gramos a cientos de kilogramos por año.

20 De esta forma, existe la necesidad de aumentar la producción de proteínas recombinantes a partir de células hospedadoras y mejorar la estabilidad a largo plazo de la expresión. Una forma de conseguir este objetivo es mejorar los títulos de proteínas expresados mediante los sistemas de expresión en células. La invención descrita aquí proporciona mutaciones que contribuyen a una mayor estabilidad de la transposasa piggyBac expresada en células  
25 hospedadoras. Se ha descubierto que las transposasas piggyBac codificadas mediante secuencias de ácidos nucleicos modificadas genéticamente donde dichas mutaciones llevan a una mejora en el título de las proteínas recombinantes expresadas en células que comprenden la transposasa piggyBac modificada genéticamente en comparación con el título de las proteínas recombinantes expresadas en células que comprenden transposasa piggyBac natural o nada de piggyBac.

30 El documento US 9783790 describe secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de enzimas transposasas piggyBac creadas modificando la transposasa de *Trichoplusia ni*.

El documento WO 2010/099296 describe proteínas transposasas piggyBac, ácidos nucleicos que codifican las transposasas, composiciones, kits y animales transgénicos no humanos que comprenden las transposasas, y métodos de uso de las transposasas.

## 35 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona una transposasa piggyBac:

(i) que comprende una sustitución de leucina por isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO: 2, una sustitución de leucina por isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO: 2, y una sustitución de treonina por serina en la posición 533 de SEQ ID NO: 2; y/o

40 (ii) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica una transposasa piggyBac como se describe anteriormente, opcionalmente en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona de ADN o ARNm.

45 La invención también proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe anteriormente.

La invención también proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe anteriormente, que comprende además al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, opcionalmente en la que el vector comprende una o más secuencias de ácido  
50 nucleico que codifican una o más proteínas de interés.

La invención también proporciona una célula transfectada con un vector o una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética como se describe anteriormente.

La invención proporciona además un método para mejorar el título de una proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora, que comprende

modificar por ingeniería genética una molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe anteriormente, para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora;

5 cotransfectar la célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica la transposasa piggyBac y con un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac; y

cultivar las células para que expresen la proteína recombinante de interés,

10 en el que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética está mejorado en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora transfectada con una transposasa piggyBac natural o sin transposasa piggyBac.

La invención proporciona además un método para aumentar la producción de proteína recombinante en un cultivo de células de mamífero que expresa una proteína recombinante, que comprende

15 establecer un cultivo celular en un biorreactor usando una célula hospedadora que se ha cotransfectado con una molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe anteriormente modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos repetición invertida de un transposón piggyBac; y

20 expresar la proteína recombinante de interés;

25 en el que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética está mejorado en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con una transposasa piggyBac natural o sin transposasa piggyBac.

La invención proporciona además un método para producir una proteína recombinante aislada, purificada, de interés, que comprende

30 establecer un cultivo celular en un biorreactor con una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante de interés, en el que la línea celular se ha cotransfectado con una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe anteriormente modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac;

cultivar las células para expresar la proteína recombinante de interés;

cosechar la proteína recombinante de interés,

35 procesar la proteína recombinante de interés a través de una o más operaciones unitarias, y

obtener una proteína recombinante aislada, purificada, de interés.

La invención proporciona además un kit para transfectar una célula, que comprende

una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe anteriormente modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora; y

40 un vector que comprende al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac en el que se inserta al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés.

La invención proporciona además un método para generar células modificadas genéticamente no virales, que comprende:

45 (a) establecer un vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac;

(b) proporcionar células inmunitarias nativas aisladas de un donante o sujeto;

(c) transfectar las células con el vector y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe anteriormente modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula; y

(d) expandir las células por cultivo celular en una población mayor de células modificadas genéticamente, no virales.

La invención proporciona además una célula modificada genéticamente no viral para uso en un método de tratamiento de un sujeto, en el que el método comprende:

5 (a) establecer un vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac;

(b) aislar células inmunitarias nativas de un sujeto o donante;

(c) transfectar las células con el vector y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe anteriormente modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula;

10 (d) expandir las células por cultivo celular en una población mayor de células modificadas genéticamente;

(e) aislar las células transformadas del cultivo celular para obtener una población celular que comprende las células modificadas genéticamente; y

(f) reintroducir en el sujeto las células modificadas genéticamente no virales.

15 La invención proporciona además una célula modificada genéticamente para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un donante o sujeto que lo necesita, que comprende administrar al donante o sujeto una cantidad eficaz de la célula modificada genéticamente, en la que la célula modificada genéticamente es una célula transfectada con un vector o una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética de la invención como se describe aquí.

#### DESCRIPCIÓN ADICIONAL

20 Se describe aquí una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533 y 573 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina por isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221 y 247 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de treonina por serina en una o más de las posiciones 429, 533 y 573 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la transposasa piggyBac comprende

25 una sustitución de aminoácidos de leucina por isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221 y 247, y/o una sustitución de aminoácidos de treonina por serina en una o más de las posiciones 429, 533 y 573 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina por la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO: 2, una leucina por la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO: 2, y una treonina por la serina en la posición 533 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina por la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO: 2, una leucina por la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO: 2, y una treonina por la serina en la posición 533 de SEQ ID NO: 2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina por isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO: 2, una sustitución de leucina por isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO: 2 y una sustitución de treonina por serina en la posición

30 533 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la transposasa piggyBac comprende el título de una proteína recombinante de interés expresada por una célula transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética como se describe aquí está mejorado en comparación con el título de la misma proteína de interés expresada por una célula transfectada con una transposasa piggyBac de tipo silvestre o sin transposasa piggyBac. En un aspecto, la proteína recombinante de interés es una proteína de unión a antígeno.

35 Se describe aquí una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula hospedadora, en la que la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533 y 573 de SEQ ID NO: 2.

40 También se describe aquí una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de

45 También se describe aquí una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de

50 También se describe aquí una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

5 En otro aspecto, la descripción describe una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o  
 10 ácido nucleico de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 18.

25 En otro aspecto, la descripción describe un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, el vector comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí, que comprende además al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, el vector comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican una o más proteínas de interés.

30 En otro aspecto, la descripción describe una célula transfectada con un vector como se describe aquí. En un aspecto, la célula se transfecta con una transposasa piggyBac codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17 o 18. En un aspecto, la célula es una célula hospedadora. En un aspecto, la célula es una célula CHO. En un aspecto, la célula es una célula inmune.

35 En otro aspecto, la descripción describe una célula cotransfectada con una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí, y un vector que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac. En otro aspecto, la descripción describe una célula cotransfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí, y un vector que comprende al menos una molécula de  
 40 ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac. En otro aspecto, la descripción describe una célula cotransfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí, y que también comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac.

45 En otro aspecto, la descripción describe una célula como se describe aquí, en la que el título de una proteína de interés expresada por la célula transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética mejora en comparación con el título de la misma proteína de interés expresada por una célula transfectada con una transposasa piggyBac de tipo silvestre o sin transposasa piggyBac. En un aspecto se proporciona una proteína recombinante de interés expresada por la célula. En un aspecto relacionado, se encuentra una composición farmacéutica que comprende la proteína recombinante de interés.

50 En otro aspecto, la descripción describe un método para mejorar el título de una proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora, que comprende modificar por ingeniería genética una molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora; cotransfectar la célula hospedadora con la molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica la transposasa piggyBac y con un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada  
 55

5 por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac; y cultivar las células para expresar la proteína recombinante de interés, en el que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética se mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora transfectada con una transposasa piggyBac de tipo silvestre o sin transposasa piggyBac. En un aspecto, la célula hospedadora se transfecta con un primer vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica la transposasa piggyBac, y con un segundo vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, la célula hospedadora se transfecta con un único vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica la transposasa piggyBac y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac.

10 En otro aspecto, la descripción describe un método para aumentar la producción de proteína recombinante en un cultivo de células de mamífero que expresa una proteína recombinante, que comprende establecer un cultivo celular en un biorreactor usando una célula hospedadora que se ha cotransfectado con una molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida de un transposón piggyBac; y expresar la proteína recombinante de interés; en el que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con una transposasa piggyBac de tipo silvestre o ninguna transposasa piggyBac. En un aspecto, la célula hospedadora se ha cotransfectado con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac diseñada para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida de un transposón piggyBac. En un aspecto, la célula hospedadora se transfecta con un único vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica la transposasa piggyBac y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertidas 5' y 3' de un transposón piggyBac.

15 En otro aspecto, la descripción describe un método para producir una proteína recombinante aislada, purificada, de interés, que comprende establecer un cultivo celular en un biorreactor con una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante de interés, en el que la línea celular se ha cotransfectado con una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac; cultivar las células para expresar la proteína recombinante de interés; recoger la proteína recombinante de interés, procesar la proteína recombinante de interés a través de una o más operaciones unitarias, y obtener una proteína recombinante aislada, purificada, de interés. En un aspecto, la línea celular se ha cotransfectado con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, la célula hospedadora se transfecta con un único vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica la transposasa piggyBac y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, al menos una operación unitaria es una etapa de cromatografía de captura seleccionada de cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía multimodal, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxipatita. La al menos una operación unitaria es una etapa de cromatografía de pulido seleccionada de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía multimodal, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxipatita. En un aspecto, al menos una operación unitaria se selecciona de inactivación de virus, filtración de virus, filtración de profundidad, y UF/DF. En un aspecto, el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con una transposasa piggyBac natural o sin transposasa piggyBac. En un aspecto, es la proteína recombinante aislada, purificada, de interés. En un aspecto relacionado, se encuentra una composición farmacéutica que comprende la proteína aislada de interés.

En un aspecto, la descripción describe un kit para transfectar una célula, que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora; y un vector que comprende al menos los elementos de repetición

invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac en el que se inserta al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés.

5 En un aspecto, la descripción describe un método para generar células modificadas genéticamente no virales, que comprende: (a) establecer un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula y al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac; (b) aislar células inmunitarias nativas de un donante o sujeto; (c) transfectar las células con el vector y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula; y (d) expandir las células por cultivo celular en una población más grande de células modificadas genéticamente no virales. En un aspecto, las células se transfectan con el vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula. En un aspecto, las células se transfectan con un vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula.

20 En un aspecto, la descripción describe una célula modificada genéticamente no viral para uso en un método de tratamiento de un sujeto, en el que el método comprende: (a) establecer un vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac; (b) aislar células inmunitarias nativas de un sujeto o donante; (c) transfectar las células con el vector y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula; (d) expandir las células por cultivo celular en una población más grande de células modificadas genéticamente; (e) aislar las células transformadas del cultivo celular para obtener una población celular que comprende las células modificadas genéticamente; y (f) reintroducir las células modificadas genéticamente no virales en el sujeto. En un aspecto, las células se transfectan con el vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula. En un aspecto, las células se transfectan con un vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula. En un aspecto, la célula inmunitaria nativa es una célula mononuclear. En un aspecto, la célula inmunitaria nativa es una célula T. En un aspecto, al menos una proteína de interés es un receptor de antígeno, un receptor de células T, o un receptor de antígeno quimérico. En un aspecto, la célula también se transfecta con una molécula de ácido nucleico que codifica un gen suicida, un interruptor inducible o acelerador, o ambos. En un aspecto, son células modificadas genéticamente no virales, poblaciones celulares, o cultivos celulares. En un aspecto, se encuentra una formulación que comprende las células modificadas genéticamente o poblaciones celulares.

40 En otro aspecto, se encuentra una célula modificada genéticamente para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un donante o sujeto que lo necesita, que comprende administrar al donante o sujeto una cantidad eficaz de las células modificadas genéticamente, en el que la célula se transfecta con un vector o una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética de la descripción.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 Figura 1: Estructura secundaria prevista. Las barras indican regiones de alfa-hélice previstas, las flechas indican regiones de lámina beta previstas.

Figura 2: Títulos de líneas de células con transposasa piggyBac modificada genéticamente mejorados o comparables, en comparación con controles con la transposasa piggyBac WT o sin transposasa piggyBac para los anticuerpos monoclonales AB1 y AB2.

50 Figura 3: Títulos de una línea de células con transposasa piggyBac modificada genéticamente mejorados en comparación con controles con transposasa piggyBac WT o sin transposasa piggyBac para una línea de células que expresa una proteína de fusión.

Figura 4: Títulos de líneas de células con transposasa piggyBac modificada genéticamente comparables, en comparación con controles con transposasa piggyBac WT o sin transposasa piggyBac para una molécula activadora de linfocitos T biespecíficos.

- Figura 5: Las combinaciones transfectadas con una transposasa piggyBac "ILT" o triple "LLT" mostraron un aumento en la expresión en comparación con las combinaciones de transposasas que no recibieron tratamiento con MSX (MSX 0  $\mu$ M). Para las combinaciones a las que no se añadió transposasa (ninguna), la expresión no aumentó con la adición de MSX. Se sometieron a ensayo BITE<sup>®</sup> HeteroFc, un IgGscFV y un mAb. Se añadió MSX a la transfección (25) o tras la recuperación de la combinación transfectada con el ADN de la transposasa inicial (0-25).
- Figura 6 A y B Niveles de expresión de la combinación asociados con el ADN o ARNm de la transposasa piggyBac doble mutante "ILT" usando métodos de electroporación o basados en lípidos.
- 6A): Método de transfección basada en electroporación que compara el ADN de transposasa con el ARNm de transposasa. Aumento de la expresión mejorada con ARNm de transposasa. 1) 0  $\mu$ g de transposasa, 20  $\mu$ g de ADN de mAb; 2) ADN del mutante doble "ILT": 20  $\mu$ g de ADN de mAb, 5  $\mu$ g de transposasa, relación 4:1; 3) ARNm del mutante doble "ILT" 20  $\mu$ g de ADN de mAb, 5  $\mu$ g de transposasa, relación 4:1; 4) ARNm del mutante doble "ILT" 20  $\mu$ g de ADN de mAb, 10  $\mu$ g de transposasa, relación 2:1; 5) ARNm del mutante doble "ILT" 20  $\mu$ g de ADN de mAb, 20  $\mu$ g de transposasa, relación 1:1; 11) ARNm del mutante doble "ILT" 14  $\mu$ g de ADN de mAb, 100  $\mu$ g de transposasa, relación 7:1; 12) ARNm del mutante doble "ILT" 28  $\mu$ g de ADN de mAb, 200  $\mu$ g de transposasa, relación 7:1.
- 6B): El método de transfección basada en lípidos que compara el ADN de transposasa con el ARNm de transposasa. Aumento de la expresión mejorada con ARNm de transposasa. ADN de la transposasa piggyBac mutante doble "ILT" 2  $\mu$ g de ADN de mAb, 0.5  $\mu$ g de transposasa, relación 4:1; 2  $\mu$ g de ADN de mAb, 2  $\mu$ g de transposasa, relación 1:1; 4  $\mu$ g de ADN de mAb, 4  $\mu$ g de transposasa, relación 1:1; ARNm de la transposasa PiggyBac mutante doble "ILT" 2  $\mu$ g de ADN de mAb, 0.5  $\mu$ g de transposasa, relación 4:1; 2  $\mu$ g de ADN de mAb, 2  $\mu$ g de transposasa, relación 1:1; 4  $\mu$ g de ADN de mAb, 4  $\mu$ g de transposasa, relación 1:1.
- Figura 7 Niveles de expresión en combinaciones transfectadas mediante electroporación. Transfección del ADN de transposasa mutante doble "ILT" y ambos ARNm. Las combinaciones transfectadas con ARNm sintético (PB syn ARNm) y ARNm (PB ARNm) tuvieron títulos similares a las combinaciones con el ADN (PB DNA) de transposasa y títulos más altos que las combinaciones del control sin transposasa. La flecha hacia abajo es Mín. La flecha hacia arriba es Máx. La barra blanca es la mediana.
- Figura 8 A y B: Integración a niveles genómicos y de transcrito del ADN y ARNm en combinaciones de líneas de células transfectadas.
- 8A) Todas las líneas de células transfectadas con el ADN de transposasa mutante doble "ILT" mostraron integración a nivel genómico, mientras que las transfectadas con ARNm no mostraron integración a nivel genómico. Una banda a ~1.7 kb indica la presencia de la transposasa en el genoma de la línea de células. Hilera 1 Escalera. Hileras 2-4 ADN de transposasa piggyBac mutante doble "ILT". Hilera 5 Sin transfección. Hileras 6-11 ARNm de transposasa piggyBac mutante doble "ILT". Hilera 12 ADN plásmido del control.
- 8B) Imagen del gel de un ensayo RT PCR para comprobar la transcripción en el ARN. Todas las líneas de células transfectadas con el ADN de transposasa mutante doble "ILT" mostraron transcripción en el ARN, mientras que las transfectadas con ARNm no transcribieron en el ARN. Una banda a ~1.7 kb indica la presencia del transcrito de la transposasa. Hilera 1 Escalera. Hileras 2-3 ARNm de transposasa piggyBac mutante doble "ILT". Hilera 4 ADN de transposasa piggyBac mutante doble "ILT". Hilera 5 ADN plásmido del control.
- Figura 9 La combinación tuvo un bajo número de copias y contenía clones que no mostraron integración de la transposasa.
- Figura 10 Linfocitos T TCR generados usando presentación génica no vírica y transposasa piggyBac muestran una función robusta *in vitro*. (A) Los linfocitos T se modificaron genéticamente con éxito para expresar TCRs usando el mutante doble, ILT. (B) Lisis de células diana y (C) proliferación de linfocitos T TCR modificados genéticamente con piggyBac después de una coincubación de 5 días con células presentadoras de antígenos.
- DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**
- Los transposones de ADN, o elementos transponibles, son elementos genéticos que se pueden movilizar de un lugar a otro en el genoma hospedador. Los elementos que se pueden transponer se dividen habitualmente en dos clases, la Clase 1 está representada por los retrotransposones, y la Clase 2 incluye los transposones de ADN de tipo "cortar y pegar".
- Los transposones de ADN de Clase 2 se caracterizan por tener dos componentes, el transposón que comprende un segmento de ADN flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas, y una transposasa que cataliza la movilización del transposón. La transposasa actúa uniendo las repeticiones invertidas, cortando el segmento de ADN (el corte) flanqueado por las repeticiones terminales invertidas y reintegrando el segmento a una nueva ubicación (el pegado).
- El transposón piggyBac es un transposón de Clase 2 y aunque se aisló originalmente de *Trichoplusia ni* (polilla de la oruga de la col), se ha comprobado que transpone activamente en células de mamíferos, con preferencia por las

estructuras accesibles de la cromatina (Li et al., *Molecular and Cellular Biology* 33(7): 1317-1330, 2013; Yoshida et al., *Scientific Reports*, número de artículo 43613 (2017)). Debido a su capacidad para introducir ADN exógeno en un genoma y promover la expresión estable del transgén, el sistema transposón piggyBac es una herramienta útil para la manipulación genética en células de mamífero y se ha utilizado para facilitar la transfección estable de células de mamífero, para generar cultivos policlonales estables y de alta producción de células de mamíferos, la producción rápida de proteínas recombinantes a partir de poblaciones heterogéneas de células transfectadas y desarrollar clones para el desarrollo de células celulares, debido a su motivo de reconocimiento que está habitualmente asociado a regiones de cromatina abierta y regiones activamente transcritas (solicitud de patente publicada con número: US 2010/0311116; Ding et al., *Cell* 122(3):473-483, 2005; Wu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(4) 15008-13, 2006, Matasci et al., *Biotechnology & Bioengineering* 108(9): 2141-50, 2011; Matasci et al., *BMC Proceedings* 5(SUPPL.8) p. 34, 2011; Balasubramanian et al., *J. Biotechnology* 200:61-9, 2015; Balasubramanian et al., *Biotechnology Progress* 32(5):1308-1317, 2016; Balasubramanian et al., *Biotechnology & Bioengineering* 113(6):1234-43, 2016; Ahmadi et al., *PLoS ONE* 12(6):e0179902, 2017; Rajendra et al., *Biotechnology Progress* 33(2):534-540, 2017; y Rajendra et al., *Biotechnology Progress* 33(6): 1436-1448, 2017.

Se han realizado esfuerzos para mejorar la eficacia de piggyBac en base molar mediante modificaciones de la transposasa para aumentar la frecuencia de escisión usando un enfoque de biblioteca de expresión y/o realizando comparaciones de secuencias con homólogos procedentes de otras especies para generar transposasas hiperactivas (véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 8,399,643; patente de Estados Unidos n.º 9,670,503; patente de Estados Unidos n.º 9,783,790; patente de Estados Unidos n.º 9,546,382; y Yusa et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(4):1531-36, 2011).

No se sabe mucho acerca de la estructura de la transposasa piggyBac. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la transposasa piggyBac muestra que es principalmente una proteína de tipo hélice alfa. En un intento de mejorar la estabilidad de la transposasa piggyBac introducida en una célula, se han realizado mutaciones dentro de las hélices alfa y sitios de glicosilación N-unidos posibles (es decir, motivo NXS/t) y se ha descubierto que esto aumentaba los títulos, como se describe aquí. Las versiones genéticamente manipuladas de las transposasas piggyBac, que incluyen mutaciones simples o combinaciones de mutaciones, se transfectaron a células junto con una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac y se evaluaron para determinar la expresión de la proteína de interés en comparación con células similares transfectadas con una transposasa piggyBac natural no mutada procedente de *Trichoplusia ni* (SEQ ID NO: 2) y células que no contenían transposasa piggyBac. Se ha descubierto que las transposasas piggyBac codificadas mediante las secuencias de ácidos nucleicos modificadas genéticamente para aumentar la estabilidad mejoraban el título de las proteínas recombinantes expresadas en células que comprendían una transposasa piggyBac modificada genéticamente en comparación con el título de las proteínas recombinantes expresadas en células que comprendían una transposasa piggyBac natural o nada de transposasa piggyBac.

Como se usa aquí, la expresión "transposón piggyBac" o "elemento de transposición piggyBac" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que se puede extirpar de un polinucleótido donante (por ejemplo, un vector) e integrarse en un sitio diana, por ejemplo el ADN genómico o extracromosómico de una célula. Por ejemplo, el elemento de transposición piggyBac de *Trichoplusia ni* tiene 2472 pb de longitud con repeticiones cortas invertidas que incluyen una estructura de repetición terminal asimétrica con un separador de 3 pb entre la repetición terminal de 13 pb en 5' y la repetición interna de 19 pb en 5', y un separador de 31 pb entre la repetición terminal de 13 pb en 3' y la repetición interna de 19 pb en 3', y un marco de lectura abierto individual de 2.1 kp que codifica una transposasa funcional. (Li et al., *Mol. Genet. Genomics* (2001) 266: 190-198; Cary et al., *Virology* (1989) 172: 156-169).

Como se usa aquí, los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac se refieren a segmentos en 5' y 3' incluido el sitio diana TTAA, separadores de repeticiones terminales, y repeticiones internas de un transposón piggyBac; en el caso de *T. ni*, estos incluyen los sitios diana TTAA, una repetición terminal de 13 pb en 5' y la repetición interna de 19 pb en 5' con un separador de 3 b entre medias, y la repetición terminal de 13 pb en 3' y la repetición interna de 19 pb en 3' y un separador de 31 pb entre medias.

Como se usa aquí, el término "transposasa de piggyBac" se refiere a un polipéptido que cataliza la escisión de un transposón piggyBac desde un polinucleótido donante (por ejemplo, un vector) y la posterior integración del transposón piggyBac en el ADN genómico o extracromosómico de una célula diana. La transposasa piggyBac utiliza un mecanismo de cortar y pegar, insertando un sitio diana TTAA que se duplica tras la inserción y se extirpa justamente tras la inserción, restaurando el sitio donante a su estado anterior al transposón. (Elick et al., *Genetica* 98: 33-41, 1996. Fraser et al., *Insect Mol. Biol.* 5: 141-151, 1996. Wang and Fraser, *Insect Mol. Biol.* 1: 109-116, 1993). La transposasa piggyBac puede estar presente como un polipéptido. Como alternativa, la transposasa piggyBac puede estar presente como una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de codificación que codifica una transposasa piggyBac. En algunos aspectos de la descripción, cuando la transposasa piggyBac está presente como una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac modificada genéticamente, la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente puede estar presente en el mismo vector que incluye el transposón piggyBac, es decir, en cis. En otros aspectos de la descripción, la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente puede estar presente en un segundo vector independiente del transposón, es decir, en trans. Las transposasas piggyBac modificadas genéticamente descritas aquí son únicas por que el título de una proteína recombinante de interés expresada por una célula que comprende una transposasa piggyBac modificada

genéticamente se mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por una célula que comprende una transposasa piggyBac natural o nada de transposasa piggyBac.

Los términos "polipéptido" o "proteína" se usan de manera intercambiable en todas partes y se refieren a una molécula que comprende dos o más restos de aminoácido unidos entre sí por enlaces peptídicos. Los polipéptidos y las proteínas también incluyen macromoléculas que tienen una o más deleciones, inserciones y/o sustituciones de los restos de aminoácido en la secuencia nativa, es decir, un polipéptido o proteína producido por una célula que se produce de manera natural y no recombinante; o se produce por una célula modificada por ingeniería genética o recombinante, y comprenden moléculas que tienen una o más deleciones, inserciones y/o sustituciones de los restos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa. Los polipéptidos y las proteínas también incluyen polímeros de aminoácidos en los que uno o más aminoácidos son análogos químicos de aminoácidos y polímeros de origen natural correspondientes. Los polipéptidos y las proteínas también incluyen modificaciones que incluyen, aunque no de forma limitativa, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación.

Se pretende que las transposasas piggyBac descritas aquí incluyan péptidos que contengan una o más inserciones, deleciones o sustituciones, o cualquier combinación de las mismas, en los restos de aminoácido, así como modificaciones diferentes a inserciones, deleciones o sustituciones de restos de aminoácidos en comparación con la secuencia de la transposasa piggyBac natural de *Trichoplusia ni* (polilla de la oruga de la col) (SEQ ID NO:2). Como se usa aquí, "sustitución de aminoácidos en una o más posiciones" significa sustituciones en 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 de las posiciones citadas. En algunos aspectos, "sustitución de aminoácidos en una o más posiciones" significa sustituciones en 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las posiciones citadas. En algunos aspectos, "sustitución de aminoácidos en una o más posiciones" significa sustituciones en 1, 2, 3, 4, o 5 de las posiciones citadas. En algunos aspectos, "sustitución de aminoácidos en una o más posiciones" significa sustituciones en 1, 2, 3, o 4, de las posiciones citadas. En algunos aspectos, "sustitución de aminoácidos en una o más posiciones" significa sustituciones en 1, 2, o 3 de las posiciones citadas. En algunos aspectos, "sustitución de aminoácidos en una o más posiciones" significa sustituciones en 1 o 2 de las posiciones citadas.

Se describe aquí una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, la transposasa comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, la transposasa comprende una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, la transposasa comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, el título de una proteína recombinante de interés expresada por una célula transfectada con la transposasa piggyBac modificada genéticamente se mejora en comparación con el título de la misma proteína de interés expresada por una célula transfectada con una transposasa piggyBac natural o nada de transposasa piggyBac.

Se describe aquí una transposasa piggyBac modificada genéticamente para aumentar la estabilidad en una célula hospedadora, en el que la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

## ES 2 991 895 T3

Tabla 1 Secuencias de aminoácidos de las transposasas piggyBac natural y mutada

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA
2	WT	<p>MGSSLDDEHILSALLQSDDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT                      EEAFIDE                      VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN                      KHCWST                      SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII                      SEIVKW                      TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN                      HMSTDDLF                      DRSLSMVYVSVMSRDRFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT                      PVRKIWDL                      FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK                      ILMACD                      SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR                      NITCDNWFT                      SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGTS                      MFCFDGP                      LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPMVMYYNQ                      TKGGVDTLT                      QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIYSHNVSSK                      GEKVQSRK                      KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG                      TSDDSTEE                      PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ                      SCF</p>
4	I147L	<p>MGSSLDDEHILSALLQSDDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT                      EEAFIDE                      VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN                      KHCWST                      SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII                      SELVKW</p>

ES 2 991 895 T3

		<p>TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN  HMSTDDL  DRSLSMVYVSVMSRDRFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT  PVRKIWDL  FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK  ILMMCD  SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR  NITCDNWFT  SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGT  MFCFDGP  LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPMVMYYNQ  TKGGVDLTD  QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIYSHNVSSK  GEKVQSRK  KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG  TSDDSTEE  PVMKKRTYCTYCPKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ  SCF</p>
6	I247L	<p>MGSSLDDEHILSALLQSDDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT  EEAFIDE  VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN  KHCWST  SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEII  SEIVKW  TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN  HMSTDDL  DRSLSMVYVSVMSRDRFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT  PVRKLWDL  FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK  ILMMCD  SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR  NITCDNWFT</p>

		<p>SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGT  MFCFDGP  LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDEDASINESTGKPQMVMYYNQ  TKGGVDTLD  QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIYSHNVSSK  GEKVQSRK  KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG  TSDDSTEE  PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ  SCF</p>
8	S533T	<p>MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT  EEAFIDE  VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN  KHCWST  SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII  SEIVKW  TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN  HMSTDDLDF  DRLSM VYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDK SIRPTLRENDVFT  PVRKIWDL  FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK  ILMMCD  SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR  NITCDNWFT  SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGT  MFCFDGP  LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDEDASINESTGKPQMVMYYNQ  TKGGVDTLD  QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIYSHNVSSK  GEKVQSRK  KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG  TSDDSTEE  PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ  SCF</p>

ES 2 991 895 T3

10	LLT (I247L I147L S533T)	<p>MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT          EEAFIDE          VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN          KHCWST          SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFFTDEII          SELVKW          TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN          HMSTDDL          DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT          PVRKLWDL          FIIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK          ILMMCD          SGTKYMINGMPYLGRTGTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR          NITCDNWFT          SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGT          MFCFDGP          LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPMVMYYNQ          TKGGVDTLD          QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIYSHNVSSK          GEKVQSRK          KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNITNLPNEVPG          TSDDSTEE          PVMKKRTYCTYCPKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ          SCF</p>
12	ILT (I247I147L S533T)	<p>MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT          EEAFIDE          VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN          KHCWST          SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFFTDEII          SEIVKW</p>

		<p>TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN  HMSTDDL  DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT  PVRKLWDL  FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK  ILMMCD  SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR  NITCDNWFT  SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGT  MFCFDGP  LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPMVMYYNQ  TKGGVDTLD  QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIYSHNVSSK  GEKVQSRK  KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG  TSDDSTEE  PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ  SCF</p>
<p>14</p>	<p>LIT (I247L  I147S533T)</p>	<p>MGSSLDDEHILSALLQSDDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT  EEAFIDE  VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN  KHCWST  SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEII  SELVKW  TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN  HMSTDDL  DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT  PVRKIWDL  FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK  ILMMCD  SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR  NITCDNWFT</p>

		<p>SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTS  MFCFDGP  LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDEDASINESTGKQPQMVMYYNQ  TKGGVDTLD  QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIYSHNVSSK  GEKVQSRK  KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNITNLPNEVPG  TSDDSTEE  PVMKKRTYCTYCP SKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ  SCF</p>
16	LLS (I247L I147L S533)	<p>MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT  EEAFIDE  VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN  KHCWST  SKSTRRSRV SALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEII  SELVKW  TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN  HMSTDDL F  DRSLSMVYVSVMSRDRDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT  PVRKLWDL  FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK  ILMMCD  SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR  NITCDNWFT  SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTS  MFCFDGP  LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDEDASINESTGKQPQMVMYYNQ  TKGGVDTLD  QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIYSHNVSSK  GEKVQSRK  KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNISNLPNEVPG  TSDDSTEE  PVMKKRTYCTYCP SKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ  SCF</p>

5

Los términos y expresiones “polinucleótido”, “molécula de ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico modificada genéticamente” se utilizan indistintamente en toda la memoria e incluyen ácidos nucleicos tanto monocatenarios como bicatenarios, e incluye ADN genómico, ARN, ARNm, ADNc o de origen sintético o alguna combinación de los mismos que no esté asociada con secuencias normalmente encontradas en la naturaleza. Las expresiones “polinucleótido aislado”, “molécula de ácido nucleico aislada”, o “molécula de ácido nucleico modificada genéticamente aislada” se

refieren específicamente a secuencias de origen sintético o aquellas que no se encuentran normalmente en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que "comprenden" secuencias específicas pueden incluir, además de las secuencias específicas, secuencias de codificación para hasta otras diez o incluso hasta otras veinte proteínas o partes de estas, o pueden incluir secuencias reguladoras unidas de forma operativa que controlan la expresión de la región codificante de las secuencias de ácidos nucleicos mencionadas, y/o puede incluir secuencias de vectores. Los nucleótidos que comprenden las moléculas de ácido nucleico pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Las modificaciones incluyen modificaciones de base tales como derivados de bromouridina e inosina, modificaciones de ribosa tales como 2',3'-didesoxirribosa y modificaciones de enlace internucleótido tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato y fosforoamidato.

Como se usa aquí, el término "aislado" significa (i) libre de al menos algunas otras proteínas o polinucleótidos con las cuales se encontraría normalmente, (ii) está esencialmente libre de otras proteínas o polinucleótidos de la misma fuente, *por ejemplo*, de la misma especie, (iii) separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de polipéptido, polinucleótidos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los cuales se asocia en la naturaleza, (iv) asociado de manera operativa (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido o polinucleótido con el cual no está asociado en la naturaleza o (v) no se da en la naturaleza.

En un aspecto, la descripción describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. La descripción también describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO:18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:18.

Tabla 2. Secuencias de ácidos nucleicos de las transposasas piggyBac natural y mutada

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
1	WT	<p>ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC                      TGCTGCAG                      AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG                      ATCAGCGACCA                      CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC                      CTCATCGACG                      AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT                      CCTGGACGAG                      CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA                      ACAGAATCCT</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA  CTGCTGGTCCA  CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA  CATCGTGCGG  AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC  GACCCCTGCT  GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG  ATCGTGAAGT  GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA  TGACCGGCGCC  ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT  TCGGCATCCT  GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC  CGACGACCTGT  TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG  CAGAGACAGA  TTCGACTTCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA  GCATCAGACC  CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG  ATCTGGGACC  TGTTATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCTGGCGC  CCACCTGACC  ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT  TCAGAATGTA  CATCCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG  ATGATGTGCG  ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT  GGGCAGAGGC  ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA  AAGAACTGAG  CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC  AACTGGTTCA</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA  CAAGCTGACC  ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA  GAGGTGCTGAA  GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC  TTCGACGGCC  CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT  GGTGTACCTG  CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC  ACCGGCAAGCC  CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG  GACACCCTGG  ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA  ACAGATGGCCC  ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA  ACAGCTTCAT  CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT  GCAGAGCCGGA  AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG  CTTCATGAGA  AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG  GACAACATCAG  CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA  CAGCACCGAGG  AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC  CAGCAAGATC  AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA  GTGATCTGCCG  GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC</p>
3	1147L	<p>ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC  TGCTGCAG  AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG  ATCAGCGACCA</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC  CTTCATCGACG  AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT  CCTGGACGAG  CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA  ACAGAATCCT  GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA  CTGCTGGTCCA  CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA  CATCGTGCGG  AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC  GACCCCTGCT  GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG  CTGGTGAAGT  GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA  TGACCGGCGCC  ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT  TCGGCATCCT  GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC  CGACGACCTGT  TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG  CAGAGACAGA  TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA  GCATCAGACC  CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG  ATCTGGGACC  TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC  CCACCTGACC  ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT  TCAGAATGTA  CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG  ATGATGTGCG</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA            GTGATCTGCCG            GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC</p>
5	I247L	<p>ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC            TGCTGCAG            AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG            ATCAGCGACCA            CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC            CTCATCGACG            AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT            CCTGGACGAG            CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGTCCCTGGCCAGCA            ACAGAATCCT            GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA            CTGCTGGTCCA            CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA            CATCGTGCGG            AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC            GACCCCTGCT            GTGCTTCAAGCTGTTCTTCCACCGACGAGATCATCAGCGAG            ATCGTGAAGT            GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA            TGACCGGCGCC            ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT            TCGGCATCCT            GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC            CGACGACCTGT            TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG            CAGAGACAGA            TTCGACTTCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA            GCATCAGACC            CACCCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG            CTGTGGGACC</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>                     TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC                      CCACCTGACC                      ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT                      TCAGAATGTA                      CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG                      ATGATGTGCG                      ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT                      GGGCAGAGGC                      ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA                      AAGAACTGAG                      CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC                      AACTGGTTCA                      CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA                      CAAGCTGACC                      ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA                      GAGGTGCTGAA                      GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC                      TTCGACGGCC                      CCCTGACCCTGGTGTCTTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT                      GGTGTACCTG                      CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC                      ACCGGCAAGCC                      CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG                      GACACCCTGG                      ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA                      ACAGATGGCCC                      ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA                      ACAGCTTCAT                      CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT                      GCAGAGCCGGA                      AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG                      CTCATGAGA                 </p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG  GACAACATCAG  CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA  CAGCACCGAGG  AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC  CAGCAAGATC  AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA  GTGATCTGCCG  GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC</p>
7	S533T	<p>ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC  TGCTGCAG  AGCGACGACGAAGTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG  ATCAGCGACCA  CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC  CTTCATCGACG  AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT  CCTGGACGAG  CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA  ACAGAATCCT  GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA  CTGCTGGTCCA  CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA  CATCGTGCGG  AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC  GACCCCTGCT  GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG  ATCGTGAAGT  GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA  TGACCGGCGCC  ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT  TCGGCATCCT  GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC  CGACGACCTGT</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG  CAGAGACAGA  TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA  GCATCAGACC  CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG  ATCTGGGACC  TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCTGGGCGC  CCACCTGACC  ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCCT  TCAGAATGTA  CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG  ATGATGTGCG  ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT  GGGCAGAGGC  ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA  AGAACTGAG  CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC  AACTGGTTCA  CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCTA  CAAGCTGACC  ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA  GAGGTGCTGAA  GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC  TTCGACGGCC  CCCTGACCCTGGTGTCTCTACAAGCCCAAGCCGCCAAGAT  GGTGTACCTG  CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC  ACCGCAAGCC  CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG  GACACCCTGG  ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA  ACAGATGGCCCC</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA  ACAGCTTCAT  CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT  GCAGAGCCGGA  AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG  CTTCATGAGA  AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG  GACAACATCAC  CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA  CAGCACCGAGG  AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC  CAGCAAGATC  AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA  GTGATCTGCCG  GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC</p>
9	LLT (I247L 1147L S533T)	<p>ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC  TGCTGCAG  AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG  ATCAGCGACCA  CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC  CTTCATCGACG  AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT  CCTGGACGAG  CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA  ACAGAATCCT  GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA  CTGCTGGTCCA  CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA  CATCGTGCGG  AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC  GACCCCTGCT  GTGCTTCAAGCTGTTCTTACCAGCAGAGATCATCAGCGAG  CTGGTGAAGT</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA  TGACCGGCGCC  ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT  TCGGCATCCT  GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC  CGACGACCTGT  TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG  CAGAGACAGA  TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA  GCATCAGACC  CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG  CTGTGGGACC  TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCTGGCGC  CCACCTGACC  ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT  TCAGAATGTA  CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG  ATGATGTGCG  ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT  GGGCAGAGGC  ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA  AAGAACTGAG  CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC  AACTGGTTCA  CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA  CAAGCTGACC  ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA  GAGGTGCTGAA  GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC  TTCGACGGCC  CCCTGACCCTGGTGTCTTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT  GGTGTACCTG</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC  ACCGGCAAGCC  CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG  GACACCCTGG  ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA  ACAGATGGCCC  ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA  ACAGCTTCAT  CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT  GCAGAGCCGGA  AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG  CTTCATGAGA  AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG  GACAACATCAC  CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA  CAGCACCGAGG  AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC  CAGCAAGATC  AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA  GTGATCTGCCG  GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC</p>
11	ILT (I147I247L S533T)	<p>ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC  TGCTGCAG  AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG  ATCAGCGACCA  CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC  CTTCATCGACG  AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT  CCTGGACGAG  CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA  ACAGAATCCT  GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA  CTGCTGGTCCA  CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA  CATCGTGCGG  AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC  GACCCCTGCT  GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG  ATCGTGAAGT  GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGGCGGAGAGCA</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>                     TGACCGGCGCC                      ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT                      TCGGCATCCT                      GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC                      CGACGACCTGT                      TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG                      CAGAGACAGA                      TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA                      GCATCAGACC                      CACCCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG                      CTGTGGGACC                      TG TTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC                      CCACCTGACC                      ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCTT                      TCAGAATGTA                      CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG                      ATGATGTGCG                      ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT                      GGGCAGAGGC                      ACCCAGACAAACGGCGTGCCCTGGGCGAGTACTACGTGA                      AAGAACTGAG                      CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC                      AACTGGTTCA                      CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA                      CAAGCTGACC                      ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA                      GAGGTGCTGAA                      GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC                      TTCGACGGCC                      CCCTGACCCTGGTGTCTTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT                      GGTGTACCTG                      CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC                      ACCGGCAAGCC                      CCAGATGGTGTATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG                      GACACCCTGG                      ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA                      ACAGATGGCCC                      ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA                      ACAGCTTCAT                      CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT                      GCAGAGCCGGA                      AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG                      CTCATGAGA                      AAGAGACTGGAAGCCCCACCCCTGAAGAGATACCTGCGG                      GACAACATCAC                      CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA                      CAGCACCAGG                      AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC                      CAGCAAGATC                      AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA                        GTGATCTGCCG                      GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC                 </p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
13	LIT (I147L I247S533T)	<p>ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC  TGCTGCAG  AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG  ATCAGCGACCA  CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC  CTTCATCGACG  AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT  CCTGGACGAG  CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA  ACAGAATCCT  GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA  CTGCTGGTCCA  CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA  CATCGTGCGG  AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC  GACCCCTGCT  GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG  CTGGTGAAGT  GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA  TGACCGGCGCC  ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT  TCGGCATCCT  GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC  CGACGACCTGT  TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG  CAGAGACAGA  TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA  GCATCAGACC  CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG  ATCTGGGACC</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>                     TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC                      CCACCTGACC                      ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT                      TCAGAATGTA                      CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG                      ATGATGTGCG                      ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT                      GGGCAGAGGC                      ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA                      AAGAACTGAG                      CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC                      AACTGGTTCA                      CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA                      CAAGCTGACC                      ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA                      GAGGTGCTGAA                      GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC                      TTCGACGGCC                      CCCTGACCCTGGTGTCTTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT                      GGTGTACCTG                      CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC                      ACCGGCAAGCC                      CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG                      GACACCCTGG                      ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA                      ACAGATGGCCC                      ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA                      ACAGCTTCAT                      CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT                      GCAGAGCCGGA                      AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG                      CTCATGAGA                 </p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG  GACAACATCAC  CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA  CAGCACCGAGG  AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC  CAGCAAGATC  AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA  GTGATCTGCCG  GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC</p>
15	LLS (I147L I247L S533S)	<p>ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC  TGCTGCAG  AGCGACGACGAAGTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG  ATCAGCGACCA  CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC  CTTCATCGACG  AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT  CCTGGACGAG  CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA  ACAGAATCCT  GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA  CTGCTGGTCCA  CCTCCAAGAGCACCAAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA  CATCGTGCGG  AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC  GACCCCTGCT  GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG  CTGGTGAAGT  GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA  TGACCGGCGCC  ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT  TCGGCATCCT  GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC  CGACGACCTGT</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG  CAGAGACAGA  TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA  GCATCAGACC  CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG  CTGTGGGACC  TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCTGGGCGC  CCACCTGACC  ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCCT  TCAGAATGTA  CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG  ATGATGTGCG  ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT  GGGCAGAGGC  ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA  AAGAACTGAG  CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC  AACTGGTTCA  CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA  CAAGCTGACC  ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA  GAGGTGCTGAA  GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC  TTCGACGGCC  CCCTGACCCTGGTGTCTCTACAAGCCCAAGCCGCCAAGAT  GGTGTACCTG  CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC  ACCGCAAGCC  CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG  GACACCCTGG  ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA  ACAGATGGCCCC</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA  ACAGCTTCAT  CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT  GCAGAGCCGGA  AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG  CTTCATGAGA  AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG  GACAACATCAG  CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA  CAGCACCGAGG  AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC  CAGCAAGATC  AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA  GTGATCTGCCG  GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC</p>
17	ARN de ILT (I147I I247L S533T)	<p>AUGGGCUCUAGCCUGGACGACGAGCACAUCCUGAGCGCC  CUGCUGCAG  AGCGACGACGAACUGGUGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG  AUCAGCGACCA  CGUGUCCGAGGACGACGUGCAGUCCGACACCGAGGAAGC  CUUCAUCGACG  AGGUGCACGAAGUGCAGCCUACCAGCAGCGGCUCCGAGA  UCCUGGACGAG  CAGAACGUGAUCGAGCAGCCUGGCAGCUCCUGGCCAGC  AACAGAAUCCU  GACCCUGCCCCAGAGAACCAUCAGAGGCAAGAACAAGCA  CUGCUGGUCCA  CCUCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGUGUCCGCCUGA  ACAUCGUGCGG  AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAAUGUGCAGAAACAUCUAC  GACCCCUUGCU  GUGCUUCAAGCUGUUCUUCACCGACGAGAUCAUCAGCGA  GAUCGUGAAGU  GGACCAACGCCGAGAUAGCCUGAAGAGGCGGGAGAGCA  UGACCGGCGCC  ACCUUCAGAGACACCAACGAGGACGAGAUCAUCGCCUUC  UUCGGCAUCCU  GGUGAUGACCGCCGUGAGAAAGGACAACCACAUGAGCAC  CGACGACCGU  UCGACAGAUCCUGAGCAUGGUGUACGUGUCCGUGAUGA  GCAGAGACAGA  UUCGACUCCUGAUCAGAUCCUGAGAAUGGACGACAAG  AGCAUCAGACC</p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>                     CACCCUGCGGGAGAACGACGUGUUCACCCCCGUGCGGAA                      GCUGUGGGACC                      UGUUCAUCCACCAGUGCAUCCAGAACUACACCCUGGGCG                      CCCACCUGACC                      AUCGAUGAGCAGCUGCUGGGCUUCAGAGGCAGAUGCCCC                      UUCAGAAUGUA                      CAUCCCCAACAAAGCCCAGCAAGUACGGCAUCAAGAUCU                      GAUGAUGUGCG                      ACAGCGGCACCAAGUACAUGAUCAACGGCAUGCCCUACC                      UGGGCAGAGGC                      ACCCAGACAAACGGCGUGCCCCUGGGCGAGUACUACGUG                      AAAGAACUGAG                      CAAGCCUGUGCAUUGGCAGCUGCAGGAACAUCACCUGCGA                      CAACUGGUUCA                      CCAGCAUCCCCUGGCCAAGAACCUGCUGCAGGAACCCU                      ACAAGCUGACC                      AUCGUGGGCACCGUGCGGAGCAACAAGCGGGAGAUCCEA                      GAGGUGCUGAA                      GAACAGCAGAUCCAGACCUGUGGGAACAAGCAUGUUCUG                      CUUCGACGGCC                      CCCUGACCCUGGUGUCCUACAAGCCCAAGCCCGCCAAGA                      UGGUGUACCU                      CUGUCCAGCUGCGACGAGGACGCCAGCAUCAACGAGAGC                      ACCGGCAAGCC                      CCAGAUGGUGAUGUACUACAACCAGACCAAGGGCGGGCGU                      GGACACCCUGG                      ACCAGAUGUGCAGCGUGAUGACCUGCAGCAGAAAGACCA                      ACAGAUGGCC                      AUGGCCUGCUGUACGGCAUGAUCAAUAUCGCCUGCAUC                      AACAGCUUCAU                      CAUCUACAGCCACAACGUGUCCAGCAAGGGCGAGAAGGU                      GCAGAGCCGGA                      AGAAAUUAUGCGGAACCUGUACAUGAGCCUGACCUCCA                      GCUUCAUGAGA                      AAGAGACUGGAAGCCCCACCCUGAAGAGAUACCUGCGG                      GACAAAUACAC                      CAACAUCCUGCCCAACGAAGUGCCAGGAACAAGCGACGA                      CAGCACCGAGG                      AACCCGUGAUGAAGAAGAGGACCUACUGCACCUACUGUC                      CCAGCAAGAUC                      AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCUGCAAGAAAUGCAAAAA                      AGUGAUCUGCCG                      GGAGCACAACAUCGACAUGUGCCAGAGCUGUUUCUAGC                 </p>
18	ARN de LLT (147L 1247L S533T)	<p>                     AUGGGCUCUAGCCUGGACGACGAGCACAUCUGAGCGCC                      CUGCUGCAG                      AGCGACGACGAACUGGUGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG                      AUCAGCGACCA                      CGUGUCCGAGGACGACGUGCAGUCCGACACCGAGGAAGC                      CUUCAUCGACG                      AGGUGCACGAAGUGCAGCCUACCAGCAGCGGCUCGAGA                 </p>

ES 2 991 895 T3

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		<p>                     UCCUGGACGAG                      CAGAACGUGAUCGAGCAGCCUGGCAGCUCCCUGGCCAGC                      AACAGAAUCCU                      GACCCUGCCCCAGAGAACCAUCAGAGGCAAGAACAAGCA                      CUGCUGGUCCA                      CCUCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGUGUCCGCCUGA                      ACAUCGUGCGG                      AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAAUGUGCAGAAACAUCUAC                      GACCCCUCCU                      GUGCUUCAAGCUGUUCUACCGACGAGAUCUACAGCGA                      GCUGGUGAAGU                      GGACCAACGCCGAGAUCAGCCUGAAGAGGGCGGGAGAGCA                      UGACCGGGCGCC                      ACCUUCAGAGACACCAACGAGGACGAGAUCUACGCCUUC                      UUCGGCAUCCU                      GGUGAUGACCGCCGUGAGAAAGGACAACCACAUGAGCAC                      CGACGACCGU                      UCGACAGAUCCUGAGCAUGGUGUACGUGUCCGUGAUGA                      GCAGAGACAGA                      UUCGACUUCUGAUCAGAUGCCUGAGAAUGGACGACAAG                      AGCAUCAGACC                      CACCCUGCGGGAGAACGACGUGUACCCCCGUGCGGAA                      GCUGUGGGACC                      UGUUCAUCCACCAGUGCAUCCAGAACUACCCCCUGGCG                      CCCACCUGACC                      AUCGAUGAGCAGCUGCUGGGCUUCAGAGGCAGAUCCCC                      UUCAGAAUGUA                      CAUCCCCAACAAAGCCCAGCAAGUACGGCAUCAAGAUCU                      GAUGAUGUGCG                      ACAGCGGCACCAAGUACAUGAUCAACGGCAUGCCCUACC                      UGGGCAGAGGC                      ACCCAGACAAACGGCGUGCCCCUGGGCGAGUACUACGUG                      AAAGAACUGAG                      CAAGCCUGUGCAUGGCAGCUGCAGGAACAUCACCUGCGA                      CAACUGGUUCA                      CCAGCAUCCCCUGGCCAAGAACCUGCUGCAGGAACCCU                      ACAAGCUGACC                      AUCGUGGGCACCGUGCGGAGCAACAAGCGGGAGAUCCCA                      GAGGUGCUGAA                      GAACAGCAGAUCCAGACCUGUGGGAACAAGCAUGUUCUG                      CUUCGACGGCC                      CCCUGACCCUGGUGUCCUACAAGCCCAAGCCCGCCAAGA                      UGGUGUACCUG                      CUGUCCAGCUGCGACGAGGACGCCAGCAUCAACGAGAGC                      ACCGGCAAGCC                      CCAGAUGGUGAUGUACUACAACCAGACCAAGGGCGGCGU                      GGACACCCUGG                      ACCAGAUUGGCAGCGUGAUGACCUGCAGCAGAAAGACCA                      ACAGAUGGCC                      AUGGCCUGCUGUACGGCAUGAUCAAUAUCGCCUGCAUC                 </p>

SEQ ID NO:	ID	SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO
		AACAGCUUCAU CAUCUACAGCCACAACGUGUCCAGCAAGGGCGAGAAGGU GCAGAGCCGGA AGAAAUUCAUGCGGAACCGUACAUGAGCCUGACCUCCA GCUUCAUGAGA AAGAGACUGGAAGCCCCACCCUGAAGAGAUACCUGCGG GACAACAUCAC CAACAUCCUGCCCAACGAAGUGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGUGAUGAAGAAGAGGACCUACUGCACCUACUGUC CCAGCAAGAUC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCUGCAAGAAAUGCAAAAA AGUGAUCUGCCG GGAGCACACAUCGACAUGUGCCAGAGCUGUUUCUAGC

5 Los polipéptidos y las proteínas de interés pueden ser de interés científico o comercial, incluyendo productos terapéuticos basados en proteínas. Las proteínas de interés incluyen, entre otras cosas, proteínas secretadas, proteínas no secretadas, proteínas intracelulares o proteínas unidas a la membrana. Los polipéptidos y las proteínas de interés se pueden producir mediante líneas de células animales recombinantes usando métodos de cultivo celular y pueden denominarse "proteínas recombinantes". La(s) proteína(s) expresada(s) pueden producirse de manera intracelular o secretarse al medio de cultivo a partir del cual pueden recuperarse y/o recogerse. La expresión "proteína aislada" o "proteína recombinante aislada" se refiere a un polipéptido o proteína de interés que se ha purificado de otras proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que podrían interferir con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, en investigación, u otro uso. Las proteínas de interés incluyen proteínas que ejercen un efecto terapéutico uniéndose a una diana, particularmente una diana entre las enumeradas a continuación, incluyendo dianas derivadas de las mismas, dianas relacionadas con las mismas y modificaciones de las mismas.

15 Las proteínas de interés incluyen las "proteínas de unión a antígeno". Una proteína de unión a antígeno se refiere a proteínas o polipéptidos que comprenden una región de unión a antígeno o porción de unión a antígeno que tiene afinidad por otra molécula a la que se une (antígeno). Las proteínas de unión a antígeno abarcan anticuerpos, peptidocuerpos, fragmentos de anticuerpos, derivados de anticuerpos, análogos de anticuerpos, proteínas de fusión (incluyendo fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) y scFv de doble cadena (divalentes), muteínas y xMAb. También se incluyen activadores de linfocitos T biespecíficos (BiTE<sup>®</sup>), activadores de linfocitos T biespecíficos que tienen extensiones, tales como extensiones de la semividua, por ejemplo HLE BiTE, Heterolg BiTE y otros, receptores de antígeno quiméricos (CAR, CAR T), y receptores de linfocitos T (TCR).

20 Un scFv es un fragmento de anticuerpo monocatenario que tiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo unidas entre sí. Véanse las patentes de EE.UU. N.º 7,741,465 y 6,319,494 así como Eshhar *et al.*, Cancer Immunol Immunotherapy (1997) 45: 131-136. Un scFv conserva la capacidad del anticuerpo original para interactuar específicamente con un antígeno diana.

25 El término "anticuerpo" incluye referencias a tanto inmunoglobulinas glicosiladas como no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase o a una región de unión a antígeno del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. A menos que se especifique otra cosa, los anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos, multiespecíficos, monoclonales, policlonales, heterolgG, biespecíficos, y oligómeros o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos incluyen el tipo IgG1, IgG2 IgG3 o IgG4. También se incluyen proteínas que tienen un fragmento o región de unión a antígeno tal como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, diacuerpos, Fd, dAb, maxicuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, V<sub>H</sub>H de un solo dominio, fragmentos de regiones determinantes de complementariedad (CDR), scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica a un polipéptido diana.

35 También se incluyen proteínas humanas, humanizadas y otras de unión a antígeno, tales como anticuerpos humanos y humanizados, que no generan respuestas inmunitarias significativamente perjudiciales cuando se administran a un ser humano.

También se incluyen proteínas modificadas, tales como proteínas modificadas químicamente mediante un enlace no covalente, enlace covalente, o tanto un enlace covalente como no covalente. También se incluyen proteínas que comprenden además una o más modificaciones postraduccionales que pueden hacerse mediante sistemas de modificación celular o modificaciones introducidas *ex vivo* mediante métodos enzimáticos y/o químicos o introducidos de otros modos.

Las proteínas de interés también pueden incluir proteínas de fusión recombinantes que comprenden, por ejemplo, un dominio de multimerización, tal como una cremallera de leucinas, una superhélice, una porción Fc de una inmunoglobulina, y similares. También se incluyen proteínas que comprenden todas o partes de las secuencias de aminoácido de antígenos de diferenciación (denominados proteínas CD) o sus ligandos o proteínas sustancialmente similares a cualquiera de estos.

En algunos aspectos, las proteínas de interés pueden incluir factores de estimulación de colonias, tales como factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF). Dichos agentes de G-CSF incluyen, aunque no de forma limitativa, Neupogen® (filgrastim) y Neulasta® (pegfilgrastim). También se incluyen factores estimulantes de la eritropoyesis (ESA), tales como Epogen® (epoetina alfa), Aranesp® (darbepoetina alfa), Dynepo® (epoetina delta), Mircera® (metioxipolietilenglicol-epoetina beta), Hematide®, MRK-2578, INS-22, Retacrit® (epoetina zeta), Neorecormon® (epoetina beta), Silapo® (epoetina zeta), Binocrit® (epoetina alfa), epoetina alfa Hexal, Abseamed® (epoetina alfa), Ratioepo® (epoetina theta), Eporatio® (epoetina theta), Biopoin® (epoetina theta), epoetina alfa, epoetina beta, epoetina zeta, epoetina theta y epoetina delta, epoetina omega, epoetina iota, activador de plasminógeno tisular, agonistas de receptor de GLP-1, así como las moléculas o variantes o análogos de los mismos y biosimilares de cualquiera de los anteriores.

En algunos aspectos, las proteínas de interés pueden incluir proteínas que se unen específicamente a una o más proteínas CD, proteínas de la familia de receptor HER, moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento, factores de crecimiento nervioso, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento similares a la insulina, factores osteoinductores, insulina y proteínas relacionadas con la insulina, coagulación y proteínas relacionadas con la coagulación, factores estimulantes de colonias (CSF), otras proteínas sanguíneas y séricas, antígenos de grupo sanguíneo; receptores, proteínas asociadas a receptores, hormonas del crecimiento, receptores de hormona del crecimiento, receptores de células T; factores neurotróficos, neurotrofinas, relaxinas, interferones, interleucinas, antígenos virales, lipoproteínas, integrinas, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteínas de membrana de superficie, proteínas de transporte, proteínas de direccionamiento, adhesinas, proteínas reguladoras e inmuno adhesinas.

En algunos aspectos las proteínas de interés se unen a una o más de las siguientes, solas o en cualquier combinación: Las proteínas CD incluyen, aunque no de forma limitativa, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD70, CD123, CD133, CD 138, CD171, y CD174, proteínas de la familia de receptor HER, incluyendo, por ejemplo, HER2, HER3, HER4 y el receptor de EGF, EGFRVIII, moléculas de adhesión celular, por ejemplo, LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y alfa v/beta 3 integrina, factores de crecimiento, incluyendo pero sin limitarse a, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"); VEGFR2, hormona del crecimiento, hormona estimulante del tiroides, hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante, factor de liberación de hormona del crecimiento, hormona paratiroidea, sustancia inhibidora mulleriana, proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos, incluyendo, por ejemplo, aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), Cripto, factores de crecimiento transformante (TGF), incluyendo, entre otros, TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 o TGF- $\beta$ 5, factores de crecimiento-I y II similares a la insulina (IGF-I e IGF-II), des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), y factores osteoinductores, insulinas y proteínas relacionadas con insulina, incluyendo pero sin limitarse a insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina y proteínas de unión a factor de crecimiento similar a la insulina; (coagulación y proteínas relacionadas con la coagulación, tales como, entre otros, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores de plasminógeno, tales como urocinasa y activador de plasminógeno tisular ("t-PA"), bombazina, trombina, trombotopoyetina y receptor de trombotopoyetina, factores estimulantes de colonias (CSF), incluyendo los siguientes, entre otros, M-CSF, GM-CSF y G-CSF, otras proteínas séricas y sanguíneas, incluyendo pero sin limitarse a albúmina, IgE y antígenos de grupos sanguíneo, receptores y proteínas asociadas a receptores, incluyendo, por ejemplo, receptor de flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptores de hormona del crecimiento y receptores de células T; factores neurotróficos, incluyendo pero sin limitarse a, factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF) y neurotrofina-3, 4, 5 o 6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6); cadena A de relaxina, cadena B de relaxina y prorelaxina, interferones, incluyendo por ejemplo, interferón-alfa, beta y gamma, interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-23, IL-12/IL-23, IL-2Ra, IL1-R1, receptor de IL-6, receptor de IL-4 y/o IL-13 para el receptor, IL-13RA2 o receptor de IL-17, IL-1RAP; antígenos virales, incluyendo pero sin limitarse a, un antígeno viral de la envuelta del SIDA, lipoproteínas, calcitonina, glucagón, factor natriurético atrial, tensoactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa y beta, encefalina, BCMA, IgKappa, ROR-1, ERBB2, mesotelina, RANTES (regulada por activación, normalmente expresada y secretada por células T), péptido asociado a gonadotropina de ratón, ADNasa, FR-alfa, inhibina y activina, integrina, proteína A o D, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa, proteínas de membrana de superficie, factor acelerante de la descomposición (DAF), envuelta del SIDA, proteínas de transporte, receptores de direccionamiento, MIC (MIC-a, MIC-B), ULBP 1-6, EPCAM, adhesinas, proteínas reguladoras, inmuno adhesinas, proteínas de unión a antígeno, somatropina, CTGF, CTLA4, eotaxina-1,

5 MUC1, CEA, c-MET, claudina-18, GPC-3, EPHA2, FPA, LMP1, MG7, NY-ESO-1, PSCA, gangliósido GD2, gangliósido GM2, BAFF, OPGL (RANKL), miostatina, Dickkopf-1 (DKK-1), Ang2, NGF, receptor de IGF-1, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), TRAIL-R2, c-Kit, B7RP-1, PSMA, NKG2D-1, proteína 1 de muerte celular programada y ligando, PD1 y PDL1, receptor de manosa/hCGp, virus de la hepatitis C, conjugado de mesotelina dsFv[PE38, Legionella pneumophila (Ily), siN gamma, proteína 10 inducida por interferón gamma (IP10), siNAR, TALL-1, linfoproteína estromal tímica (TSLP), proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), factores de células madre, Flt-3, peptidasa relacionada con el gen de calcitonina (CGRP), OX40L,  $\alpha 4\beta 7$ , específica de plaquetas (glicoproteína de plaquetas lib/IIb (PAC-1), factor de crecimiento transformante beta (TFG $\beta$ ), proteína de unión a espermatozoos de la zona pelúcida 3 (ZP-3), TWEAK, receptor de factor de crecimiento derivado de las plaquetas alfa (PDGFR $\alpha$ ), esclerostina, y fragmentos o variantes biológicamente activos de cualquiera de los anteriores.

10 En otro aspecto, las proteínas de interés incluyen abcximab, adalimumab, adecatumumab, aflibercept, alemtuzumab, alirocumab, anakinra, atacicept, basiliximab, belimumab, bevacizumab, biosozumab, blinatumomab, brentuximab vedotin, brodalumab, cantuzumab mertansine, canakinumab, cetuximab, certolizumab pegol, conatumumab, daclizumab, denosumab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, epratuzumab, etanercept, evolocumab, galiximab, ganitumab, gemtuzumab, golimumab, ibritumomab tiuxetano, infliximab, ipilimumab, lerdelimumab, lumiliximab, lxdkizumab, mapatumumab, motesanib difosfato, muromonab-CD3, natalizumab, nesiritida, nimotuzumab, nivolumab, ocrelizumab, ofatumumab, omalizumab, oprelvekin, palivizumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, pexelizumab, ranibizumab, rilotumumab, rituximab, romiplostim, romosozumab, sargamostim, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab, visilizumab, volociximab, zanolimumab, zalutumumab, y biosimilares de cualquiera de los anteriores.

15 Las proteínas de interés de acuerdo con la descripción abarcan cualquiera de las anteriores e incluyen además anticuerpos que comprenden 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. También se incluyen variantes que comprenden una región que es el 70% o más, especialmente el 80% o más, más especialmente el 90% o más, aún más especialmente el 95% o más, particularmente el 97% o más, más particularmente el 98% o más, aún más particularmente el 99% o más idéntica en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos de referencia de una proteína de interés. La identidad en este sentido puede determinarse usando una variedad de software de análisis de secuencias de aminoácidos bien conocido y fácilmente disponible. El software preferido incluye los que implementan los algoritmos de Smith-Waterman, considerados una solución satisfactoria al problema de buscar y alinear secuencias. Pueden emplearse también otros algoritmos, particularmente cuando la velocidad es una consideración importante. Los programas comúnmente empleados para la alineación y la coincidencia de homología de ADN, ARN y polipéptidos que pueden usarse en este sentido incluyen FASTA, TFASTA, BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN, PROSRCH, BLAZE y MPSRCH, siendo este último una implementación del algoritmo de Smith-Waterman para su ejecución en procesadores masivamente en paralelo producidos por MasPar.

20 Las proteínas de interés también puede incluir receptores modificados genéticamente tales como receptores de antígeno quiméricos (CAR o CAR-T) y receptores de linfocitos T (TCR), así como otras proteínas que comprende una molécula de unión a antígeno que interactúa con el antígeno diana. Los CAR se pueden modificar por ingeniería genética para que se unan a un antígeno (tal como un antígeno de la superficie celular) mediante la incorporación de una molécula de unión al antígeno que interactúa con dicho antígeno diana. Los CAR incorporan normalmente un dominio de unión a antígeno (tal como scFv) en tándem con uno o más dominios coestimuladores ("de señalización") y uno o más dominios de activación.

25 Preferentemente, la molécula de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo del mismo, y es más preferentemente uno o más fragmentos de anticuerpo monocatenarios ("scFv"). Los scFv se prefieren para su uso en receptores de antígeno quiméricos porque se pueden modificar genéticamente para formar parte de una sola cadena junto con los otros componentes del CAR. Véanse Krause et al., J. Exp. Med., 188(4): 619-626, 1998; Finney et al., Journal of Immunology, 161: 2791-2797, 1998.

30 Los receptores de antígeno quiméricos incorporan uno o más dominios coestimuladores (de señalización) para aumentar su potencia. Véanse las patentes de EE.UU. N.º 7,741,465 y 6,319,494, así como Krause *et al.* y Finney *et al.* (supra), Song *et al.*, Blood 119: 696-706 (2012); Kalos *et al.*, Sci Transl. Med. 3:95 (2011); Porter *et al.*, N. Engl. J. Med. 365:725-33 (2011), y Gross *et al.*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56:59-83 (2016). Los dominios coestimuladores adecuados se pueden derivar de, entre otras fuentes, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (alfa, beta, delta, épsilon, gamma, zeta), CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD 33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función linfocítica (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 14; TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor gamma Fc, molécula MHC clase I, TNF, TNFr, integrina, molécula de activación linfocítica de señalización, BTLA, receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI-Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI-Ia, LFA-1, ITGAM, CDI-Ib, ITGAX, CDI-Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, 41-BB, GADS, SLP-76, PAG/Cbp,

CD19a, ligando CD83, o fragmentos o combinaciones de los mismos. El dominio coestimulador puede comprender uno o más porciones extracelulares, una porción transmembrana y una porción intracelular.

Los CAR también incluyen uno o más dominios de activación. CD3 zeta es un elemento del receptor de linfocitos T en los linfocitos T naturales, y se ha comprobado que es un elemento de activación intracelular importante en los CAR.

- 5 Los CAR son proteínas transmembrana, que comprenden un dominio extracelular, que típicamente contiene una proteína de unión a antígeno que puede reconocer y unirse al antígeno de interés, y también incluye una región de "bisagra". Además, hay un dominio transmembrana y dominio intracelular (citoplásmico).

10 El dominio extracelular es beneficioso para la señalización y para una respuesta eficaz de los linfocitos a un antígeno. De cualquier proteína descrita aquí o cualquier combinación de las mismas. El dominio extracelular se puede derivar de una fuente tanto natural como sintética, tales como las proteínas descritas aquí. Los dominios extracelulares a menudo comprenden una parte de bisagra. Esta es una porción del dominio extracelular, a menudo conocida como una región "espaciadora". Las bisagras se pueden derivar de proteínas que se describen en el presente documento, especialmente las proteínas coestimuladoras anteriormente descritas, así como secuencias de inmunoglobulinas (Ig) u otras moléculas adecuadas para lograr la distancia especial deseada desde la célula diana.

- 15 Un dominio transmembrana se puede fusionar al dominio intracelular del CAR. De manera similar, se puede fusionar al dominio intracelular del CAR. El dominio transmembrana se puede derivar de una fuente tanto natural como sintética, tales como las proteínas descritas aquí, especialmente las proteínas coestimuladoras anteriormente descritas.

20 Un dominio intracelular (citoplásmico) se puede fusionar con el dominio transmembrana y puede proporcionar la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas. Los dominios intracelulares se pueden derivar de las proteínas descritas aquí, especialmente de CD3.

Se puede utilizar una variedad de técnicas conocidas para elaborar los polinucleótidos, polipéptidos, vectores, células hospedadoras, células inmunitarias, composiciones y similares de acuerdo con la descripción.

25 También se describen aquí sistemas y construcciones en la forma de plásmidos, vectores de expresión, casetes de expresión o transcripción que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico como se describe anteriormente, así como células hospedadoras que comprenden dichas construcciones o sistemas de expresión. Como se usa aquí, "vector" significa cualquier molécula o entidad (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido, bacteriófago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, cápsida de virus, virión, ADN puro, ADN complejado y similares) adecuada para su uso para usar para transferir y/o transportar una proteína que codifica información hasta una célula hospedadora y/o hasta una localización específica y/o compartimento dentro de una célula hospedadora. Los vectores pueden incluir vectores víricos y no víricos, vectores mamíferos no episómicos. Los vectores se denominan frecuentemente como vectores de expresión, por ejemplo, vectores de expresión recombinante y vectores de clonación. El vector puede introducirse en una célula hospedadora para permitir la replicación del propio vector y, de ese modo, amplificar las copias del polinucleótido contenido en la misma. Los vectores de clonación pueden contener componentes de secuencia que generalmente incluyen, sin limitación, un origen de replicación, secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción, secuencias potenciadoras y marcadores seleccionables. Estos elementos pueden seleccionarse según sea apropiado por una persona con experiencia ordinaria en la técnica.

35 Los vectores son útiles para la transformación de una célula hospedadora y contienen secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan (junto con la célula hospedadora) la expresión de una o más regiones de codificación heterólogas a las que se unen de manera operativa. Una construcción de expresión puede incluir, de modo no taxativo, secuencias que afecten o controlen la transcripción, traducción y, de haber intrones presentes, afecten el corte y empalme de ARN de una región codificante a la que se une de manera operativa. "Unido de manera operativa" hace referencia a que los componentes a los que se aplica la expresión se encuentran en una relación que permite que se lleven a cabo sus funciones inherentes. Por ejemplo, una secuencia de control, por ejemplo, un promotor, en un vector que está "unida de manera operativa" a una secuencia que codifica una proteína está dispuesta de tal forma que la actividad normal de la secuencia de control produce la transcripción de la secuencia de codificación de la proteína que da como resultado una expresión recombinante de la proteína codificada.

40 Los vectores se pueden seleccionar para que sean funcionales en la célula hospedadora particular que se utiliza (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedadora, lo cual permite que suceda la amplificación y/o expresión del gen). En algunos aspectos, se utilizan vectores que emplean ensayos de complementación proteína-fragmento con proteínas indicadoras, tales como dihidrofolato reductasa (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,270,964). Los vectores de expresión adecuados son conocidos en la materia y también están disponibles comercialmente.

45 Típicamente, los vectores utilizados en cualquiera de las células hospedadoras contienen secuencias para el mantenimiento de plásmidos y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias incluirán típicamente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, secuencias de control de la transcripción y la traducción, una secuencia de finalización de la transcripción, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio donante y aceptor

- de corte y empalme, varias presecuencias o prosecuencias para mejorar la glucosilación o el rendimiento, una secuencia de señalización natural o heteróloga (secuencia líder o péptido de señalización) para la secreción del polipéptido, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, secuencias del sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), un elemento de secuencia que aumenta la expresión (EASE), un líder tripartito (TPA) y ARN del gen VA del Adenovirus 2, una región polienlazadora para insertar el polinucleótido que codifica el polipéptido a expresar, y un elemento marcador seleccionable. Los vectores se pueden construir a partir de un vector de partida tal como un vector comercial, los elementos adicionales se pueden obtener individualmente y ligarse en el vector. El experto en la técnica conoce métodos utilizados para obtener cada uno de los componentes.
- Los componentes de un vector pueden ser homólogos (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogos (es decir, de una especie que no sea de la especie o cepa de la célula hospedadora), híbridos (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticos o naturales. Las secuencias de los componentes útiles en los vectores se pueden obtener por métodos bien conocidos en la materia tales como los anteriormente identificados por métodos de cartografiado y/o mediante endonucleasas de restricción. Además, se pueden obtener mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o mediante cribado una genoteca con sondas adecuadas.
- Generalmente es necesario un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento normalmente está situado en 3' respecto al promotor y en 5' respecto a la secuencia codificante del polipéptido que se va a expresar.
- Un origen de replicación ayuda en la amplificación del vector en una célula hospedadora. Estos se pueden incluir como parte de vector procariotas comercialmente disponibles y también se pueden sintetizar químicamente basándose en una secuencia conocida y unida al vector. Son útiles diversos orígenes víricos (por ejemplo, SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), o virus del papiloma tales como VPH o VPB) para clonar vectores en células de mamífero.
- Las secuencias de control de la transcripción y la traducción para los vectores de expresión en células hospedadoras de mamífero se pueden cortar de los genomas víricos. Las secuencias promotoras y potenciadoras habitualmente utilizadas se derivan del virus del polioma, adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40), y citomegalovirus humano (CMV). Por ejemplo, el promotor/potenciador del CMV humano del gen temprana inmediato 1 puede ser de utilidad. Véase por ejemplo Patterson et al. (1994), *Applied Microbiol. Biotechnol.* 40:691-98. Las secuencias de ADN derivadas del genoma del virus SV40, por ejemplo, el origen de SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, corte y empalme y sitios de poliadenilación se pueden utilizar para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de un gen estructural en una secuencia génica en una célula hospedadora de mamífero. Los promotores temprano y tardío víricos son especialmente útiles por que ambos se obtienen fácilmente a partir de un genoma vírico como un fragmento, que también puede contener un origen de replicación vírico (Fiers et al. (1978), *Nature* 273:113; Kaufman (1990), *Meth. in Enzymol.* 185:487-511). Los fragmentos de SV40 más pequeños o más grandes también pueden ser de utilidad, siempre que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio Hind III hasta el sitio Bgl I situado en el orígenes de replicación vírico de SV40.
- Una secuencia de terminación de la transcripción normalmente está situada en 3' respecto al extremo de una región codificante del polipéptido y sirve para finalizar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia de poli-T. Si bien la secuencia puede clonarse fácilmente a partir de una biblioteca o incluso puede adquirirse en el mercado como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente con el uso de métodos para la síntesis de ácidos nucleico conocidos por los expertos en la materia.
- Un gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula hospedadora cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) transmiten resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina a las células hospedadoras procariotas; (b) complementan las deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) proporcionan nutrientes cruciales no disponibles de medios complejos o definidos. Los marcadores seleccionables específicos son el gen de resistencia a la kanamicina, el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina. Ventajosamente, también se puede utilizar un gen de resistencia a la neomicina para la selección en tanto células hospedadoras procariotas como eucariotas.
- Se pueden utilizar otros genes seleccionables para amplificar el gen que se va a expresar. La amplificación es el proceso en el que los genes necesarios para producir una proteína crucial para el crecimiento o la supervivencia celular se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos incluyen el sistema glutamina sintasa (GS)/metionina sulfoximina (MSX) y los genes de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa sin promotor. Los transformantes de células de mamífero se someten a presión de selección en la que solamente los transformantes se adaptan de forma singular para sobrevivir en virtud del gen seleccionable presente en el vector. La presión de selección se impone mediante el cultivo de las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio aumenta sucesivamente, llevando así a la amplificación tanto del gen seleccionable

como del ADN que codifica una proteína de interés. Como resultado, se sintetizan mayores cantidades de un polipéptido de interés a partir del ADN amplificado.

En algunos casos, tal como cuando se busca la glicosilación en un sistema de expresión de célula hospedadora eucariota, es posible manipular las distintas presecuencias o prosecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de la peptidasa de un péptido de señalización en particular, o agregar prosecuencias, las cuales también pueden afectar la glicosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición -1 (relativa al primer aminoácido de la proteína madura), uno o más aminoácidos adicionales inherentes para la expresión, que pueden no haberse eliminado por completo. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o más restos de aminoácidos que se encuentran en el sitio de escisión de la peptidasa, unidos al extremo amino. Como alternativa, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en esa zona dentro del polipéptido maduro.

La expresión y clonación normalmente contendrán un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido de forma operativa a la molécula que codifica la proteína de interés. Los promotores son secuencias no transcritas ubicadas antes (es decir, en dirección 5') hacia el codón de inicio de un gen estructural (generalmente a una distancia aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles mayores de transcripción de ADN bajo su control como respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de la temperatura. Por el contrario, los promotores constitutivos transcriben de manera uniforme el gen al que está unidos de forma operativa, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión génica. Se conoce un gran número de promotores, reconocidos por diversidad de células hospedadoras potenciales.

También se conocen en la técnica promotores adecuados para utilizar con hospedadores de levadura. Los potenciadores de levadura se utilizan ventajosamente con promotores de levadura. Los promotores adecuados para usar con células hospedadoras de mamífero son conocidos e incluyen, de forma no limitativa, los obtenidos de los genomas de virus tal como poliomavirus, viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus del Simio 40 (SV40). Otros promotores mamíferos adecuados incluyen promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, aunque no de forma limitativa: el promotor temprano del SV40 (Benoist y Chambon, 1981, Nature 290:304-310); el promotor del CMV (Thomsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. EE. UU. 81:659-663); el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797); el promotor de la timidina cinasa del herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); la gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); las secuencias promotoras y reguladoras del gen de la metalotionina (Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42); y promotores procaríotas tales como el promotor de la beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731); o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). También son de interés las siguientes regiones de control transcripcional de origen animal, que presentan especificidad tisular y han sido utilizadas en animales transgénicos: la región de control del gen I de la elastasa que es activo en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Omitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que está activo en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); la región de control del gen de la inmunoglobulina que está activo en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); la región de control del virus del tumor mamario de ratón que está activo en células testiculares, de mama, linfoides y en mastocitos (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); la región de control del gen de la albúmina que está activo en el hígado (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276); la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que está activo en el hígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); la región de control del gen de la alfa-1-antitripsina que está activo en el hígado (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); la región de control del gen de la globina beta que está activa en las células mieloides (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina que está activa en las células oligodendrocitos en el cerebro (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); la región de control del gen de la miosina de cadena ligera 2 que está activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, Nature 314:283-286); y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que está activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Se puede insertar una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción en eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, generalmente con una longitud de alrededor de 10-300 pb, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición, habiéndose encontrado en posiciones tanto 5' como 3' respecto a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamífero (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Sin embargo, normalmente se utiliza un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de polioma y los potenciadores de adenovirus conocidos en la técnica son ejemplos de elementos para la activación de promotores

eucariotas. Aunque un potenciador pueda estar situado en el vector ya sea en 5' o 3' respecto a una secuencia codificante, normalmente está situado en la zona 5' del promotor.

Se puede incorporar una secuencia que codifica una secuencia de señalización natural o heteróloga adecuada (secuencia líder o péptido de señalización) a un vector de expresión, para fomentar la secreción extracelular de la proteína de interés. La selección del péptido de señalización o líder depende del tipo de células hospedadoras en las que el se va a producir la proteína de interés, y una secuencia de señalización heteróloga puede sustituir la secuencia de secuencia de señalización natural. Los ejemplos de péptidos de señalización que son funcionales en células hospedadoras de mamíferos incluyen los siguientes: la secuencia de señalización de la interleucina-7 descrita en la patente de Estados Unidos n.º 4,965,195; la secuencia de señalización del receptor de interleucina 2 descrita en Cosman et al., 1984, Nature 312:768; el péptido de señalización del receptor de interleucina-4 descrito en la patente EP n.º 0367 566; el péptido de señalización del receptor de interleucina-1 tipo I descrito en la patente de Estados Unidos N.º 4,968,607; el péptido de señalización del receptor de la interleucina-1 tipo II descrito en la patente EP n.º 0 460 846.

Secuencias de control adicionales que han mostrado mejorar la expresión de genes heterólogos procedentes de vectores de expresión de mamíferos incluyen elementos tales como el elemento que aumenta la expresión de la secuencia (EASE) derivada de células CHO (Morris et al., en Animal Cell Technology, pp. 529-534 (1997); patentes de Estados Unidos con números 6,312,951 B1, 6,027,915, y 6,309,841 B1) y el líder tripartito (TPL) y el gen VA de ARN del Adenovirus 2 (Gingeras et al. (1982), J. Biol. Chem. 257:13475-13491). Las secuencias de entrada al ribosoma (IRES) de origen vírico permite que los ARNm dicistrónicos se traduzcan eficazmente (Oh y Sarnow (1993), Current Opinion in Genetics and Development 3:295-300; Ramesh et al. (1996), Nucleic Acids Research 24:2697-2700).

En un aspecto, la descripción describe un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, el vector comprende además un transposón piggyBac que comprende un sitio de inserción para al menos una molécula de ácido nucleico exógeno que codifica al menos una proteína de interés. En un aspecto, múltiples proteínas de interés se expresan mediante la una o varias moléculas nucleicas exógenas. En un aspecto, el vector incluye construcciones bicistrónicas o multicistrónicas que codifican múltiples proteínas de interés. En un aspecto, el trasposón comprende al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO:18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:18.

Se describe aquí una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID

NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

En un aspecto, un único vector que comprende una transposasa piggyBac como se describe aquí y un transposón que comprende un sitio de inserción para al menos una molécula de ácido nucleico exógeno que codifica al menos una proteína de interés se puede transfectar a una célula. En un aspecto, la descripción describe una molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí, que comprende además al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, múltiples proteínas de interés se expresan mediante la una o varias moléculas nucleicas exógenas. En un aspecto, el vector incluye construcciones bicistrónicas o multicistrónicas que codifican múltiples proteínas de interés.

En otro aspecto, la descripción describe un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí y un segundo vector que comprende el transposón piggyBac que comprende un sitio de inserción de uno más moléculas de ácido nucleico exógena que codifica al menos una proteína de interés, en el que los dos vectores se pueden cotransfectar a una célula. En un aspecto relacionado, el transposón comprende al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, múltiples proteínas de interés se expresan mediante la una o varias moléculas nucleicas exógenas. En un aspecto, el vector incluye construcciones bicistrónicas o multicistrónicas que codifican múltiples proteínas de interés.

Tras la construcción, se pueden insertar uno o más vectores en una célula adecuada para su amplificación y/o expresión en polipéptidos. La transformación de un vector de expresión en una célula seleccionada se puede llevar a cabo por métodos bien conocidos incluidos transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, nucleofección, microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, administración mediada por lípidos catiónicos, transfección mediada por liposoma, bombardeo de microproyectiles, administración génica mediada por receptor, administración mediada por polilisina, histona, quitosana, y péptidos. El método seleccionado dependerá en parte del tipo de célula hospedadora que se vaya a utilizar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por el experto en la materia y se definen en manuales y otras publicaciones técnicas, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).

Como se usa aquí, el término "transformación" se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y a una célula que se ha transformado cuando se ha modificado para contener un nuevo ADN o ARN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente a partir de su estado natural mediante la introducción de nuevo material genético mediante transfección, transducción u otras técnicas. Después de la transfección o la transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula o puede mantenerse de manera transitoria como un elemento episómico, sin replicarse, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha "transformado de manera estable" cuando el ADN transformante se replica con la división de la célula.

Como se usa aquí, el término "transfección" se refiere a la captación de ADN extraño o exógeno por una célula. Numerosas técnicas de transfección son bien conocidos en la materia y se divulgan en el presente documento. Véase, por ejemplo, Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, supra; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu et al., 1981, *Gene* 13:197.

Como se usa aquí, el término "transducción" se refiere al proceso mediante el cual se introduce ADN extraño en una célula mediante un vector vírico. Véase Jones et al., (1998). *Genetics: principles and analysis*. Boston: Jones & Bartlett Publ.

Una "célula" o "células" incluyen cualquier célula procariota o eucariota. Las células pueden estar ex vivo, in vitro, o in vivo, tanto separadas como formando parte de una estructura superior tal como un tejido o un órgano. Las células incluyen "células hospedadoras", también denominadas como "líneas de células", que se han modificado genéticamente para expresar un polipéptido de interés comercial o científico. Las células hospedadoras se derivan

típicamente de un linaje que procede de un cultivo primario que se puede mantener en cultivo durante un tiempo ilimitado. Modificar genéticamente la célula hospedadora implica transfectar, transformar o transducir las células con una molécula polinucleotídica recombinante, y/o alterar de otra forma (por ejemplo, mediante recombinación homóloga y activación génica o fusión de una célula recombinante con una célula no recombinante) para hacer que la célula hospedadora exprese un polipéptido recombinante deseado. Los métodos y vectores para modificar genéticamente células y/o líneas de células para expresar un polipéptido de interés son bien conocidos por los expertos en la materia; por ejemplo, se ilustran varias técnicas en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, Nueva York, 1990, y actualizaciones trimestrales); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69.

Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o célula eucariota (por ejemplo, células de levadura, de insectos o de animal (por ejemplo, células CHO)). El ADN del vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas por medio de técnicas de transformación o transfección convencionales. Las células procariotas incluyen eubacteria, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tal como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacillus*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura del pan común, es la más utilizada comúnmente entre microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, otros numerosos géneros, especies y cepas están fácilmente disponibles y son de utilidad en el presente documento, tales como *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, *Yarrowia*; *Candida*; *Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *nidulans* y *niger*.

Las líneas de células animales se derivan de células cuyos progenitores se derivan de un animal multicelular. Un tipo de línea de células animales es una línea de células de mamífero. Una amplia diversidad de líneas de células de mamífero adecuadas para su crecimiento en cultivo están comercialmente disponibles de la American Type Culture Collection (Manassas, Va.) y proveedores comerciales. Los ejemplos de líneas de células habitualmente utilizadas en la industria incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionaria humana (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, (Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59, 1977); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23 : 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata de Búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hepatoma humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68, 1982); células MRC 5 o células FS4; células de mieloma de mamífero y varias líneas celulares diferentes y células de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO se utilizan ampliamente para producir proteínas recombinantes complejas. Las líneas de células mutantes deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub et al. (1980), Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220), DXB11 y DG-44, son líneas de células hospedadoras CHO deseables por que el sistema de expresión génica DHFR seleccionable y amplificable permite un elevado nivel de expresión de proteínas recombinantes en estas células (Kaufman R. J. (1990), Meth Enzymol 185:537-566). También se incluyen las líneas de células CHOK1SV con glutamina sintetasa (GS) desactivada genéticamente, que aplica la selección con metionina sulfoximina (MSX) basada en glutamina sintetasa (GS). También se incluyen las células CHOK1 (ATCC CCL61). Además, estas células son fáciles de manipular como cultivos adherentes o en suspensión y presentan una estabilidad genética relativamente buena. Las células CHO y las proteínas expresadas de forma recombinante en estas se han caracterizado ampliamente y se han autorizado para su uso en la fabricación clínica comercial por los organismos reguladores.

Las células también pueden incluir células mononucleares, células mononucleares de sangre periférica, células mononucleares derivadas de médula ósea, células mononucleares derivadas de la sangre del cordón umbilical, linfocitos, monocitos, células dendríticas, macrófagos, linfocitos T, linfocitos T no expuestos a tratamiento, linfocitos T de memoria, linfocitos CD28<sup>+</sup>, linfocitos CD4<sup>+</sup>, linfocitos CD8<sup>+</sup>, linfocitos CD45RA<sup>+</sup>, linfocitos CD45RO<sup>+</sup>, linfocitos citotóxicos naturales, citoblastos hematopoyéticos, embriocitoblastos pluripotentes, citoblastos pluripotentes inducidos o combinaciones de los mismos. En particular, las células se pueden recoger de un donante o sujeto con el fin de modificar genéticamente y reintroducir las células del donante o del sujeto.

En un aspecto, se describe una célula transfectada con una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos que se describe aquí. En un aspecto, la descripción describe una célula transfectada con una transposasa piggyBac codificada mediante una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o 18. En un aspecto, la descripción describe una célula transfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, la descripción describe una célula transfectada con una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí y un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En otro aspecto, la descripción describe una célula contrasfectada con un vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí y un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de interés

flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, la descripción describe una célula transfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí y una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto relacionado, la célula es una línea de células. En un aspecto relacionado, la célula es una célula hospedadora. En un aspecto relacionado, la célula es una célula CHO. En un aspecto relacionado, el título de una proteína recombinante de interés expresada en la célula transfectada con la transposasa piggyBac modificada genéticamente se mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por una célula transfectada con una transposasa piggyBac natural o nada de transposasa piggyBac. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO:18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:18.

Se describe aquí una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

En un aspecto, la descripción describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac para aumentar la estabilidad en una célula y transfectar la célula con un vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac modificada genéticamente y una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés flanqueada por al menos los

elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac, en la que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula transfectada con la transposasa piggyBac modificada genéticamente se mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por una célula transfectada con una transposasa piggyBac natural o nada de transposasa piggyBac. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 18.

Se describe aquí una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

En un aspecto, la descripción describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac para aumentar la estabilidad en una célula y cotransfectar la célula con un vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac modificada genéticamente y un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac, en la que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula transfectada con la transposasa piggyBac modificada genéticamente se mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por una célula transfectada con una transposasa piggyBac natural o nada de transposasa piggyBac.

También se describe una célula hospedadora transfectada con un vector que incluye un ácido nucleico que codifica una proteína de interés, que cuando se cultiva en condiciones adecuadas, expresa la proteína de interés. La proteína expresada puede recogerse posteriormente del medio de cultivo (si la célula hospedadora la secreta al medio) o directamente de la célula hospedadora que la ha producido (si no se secreta). La selección de una célula hospedadora adecuada dependerá de diversos factores, tales como los niveles de expresión deseados, las modificaciones del polipéptido que son deseables o necesarias para la actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y la facilidad para plegarse en una molécula biológicamente activa.

Se describe aquí una proteína recombinante de interés expresada por una célula transfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, la descripción describe una célula transfectada con un vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí, comprendiendo el vector además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, la descripción describe una proteína recombinante de interés expresada por una célula cotransfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí y un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac.

Se describe aquí una composición farmacéutica que comprende una proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora cotransfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, la descripción describe una célula hospedadora transfectada con un vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí, comprendiendo el vector además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. Se describe aquí una composición farmacéutica que comprende una proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora cotransfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí y un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac.

Por "cultivo celular" o "cultivo" se entiende el crecimiento y la propagación de células fuera de un organismo o tejido multicelular. En la técnica se conocen condiciones de cultivo adecuadas para células de mamífero. Medio de cultivo celular y medio de cultivo de tejido se utilizan indistintamente para referirse a los medios adecuados para el crecimiento de una célula hospedadora durante el cultivo de células *in vitro*. De forma típica, el medio de cultivo celular contiene un tampón, sales, fuente de energía, aminoácidos, vitaminas, y elementos traza esenciales. Se puede usar cualquier medio capaz de soportar el crecimiento de la célula hospedadora adecuada en cultivo. El medio de cultivo de células, que se puede suplementar adicionalmente con otros componentes para maximizar el crecimiento celular, la viabilidad de las células y/o la producción de proteínas recombinantes en una célula hospedadora cultivada en particular, están comercialmente disponibles e incluyen el medio RPMI-1640, el medio RPMI-1641, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle, el medio F-12K, el medio F12 de Ham, el medio Iscove modificado por Dulbecco, el medio 5A de McCoy, el medio L-15 de Leibovitz y medios exentos de suero tales como la serie EX-CELL™ 300, entre otros, que se pueden obtener de la American Type Culture Collection o SAFC Biosciences, así como de otros proveedores. El medio de cultivo de células pueden estar exentos de suero, exentos de proteínas, exentos de factores de crecimiento, y/o exentos de peptonas. El cultivo de células también se puede enriquecer por adición de nutrientes y usarse en concentraciones mayores que las habituales recomendadas.

Se pueden usar varias formulaciones de medios durante la vida del cultivo, por ejemplo, para facilitar la transición desde una etapa (por ejemplo, la etapa o fase de crecimiento) a otra (por ejemplo, la etapa o fase de producción) y/o para optimizar las condiciones durante el cultivo de las células (por ejemplo, medios concentrado proporcionado durante la perfusión del cultivo). Se puede usar una formulación de medio de cultivo para fomentar el crecimiento de células y minimizar la expresión de proteínas. Se puede usar una formulación de medio de producción para fomentar la producción de la proteína de interés y el mantenimiento de las células, con un mínimo de nuevo crecimiento celular). Un medio de alimentación, que contiene típicamente componentes más concentrados tales como nutrientes y aminoácidos, que se consumen durante la fase de producción del cultivo celular, puede usarse para suplementar y mantener un cultivo activo, especialmente un cultivo operado en modo de alimentación discontinuo, semiperfusión o perfusión. Dicho medio de alimentación concentrado puede contener la mayoría de los componentes del medio de cultivo celular en, por ejemplo, aproximadamente 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 12x, 14x, 16x, 20x, 30x, 50x, 100x, 200x, 400x, 600x, 800x, o incluso aproximadamente 1000x de su cantidad normal.

La fase de crecimiento se puede producir a una temperatura superior a la de la fase de producción. Por ejemplo, una fase de crecimiento se puede producir a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38°C, y una fase de producción se puede producir a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 37°C, opcionalmente de aproximadamente 30°C a aproximadamente 36°C o de aproximadamente 30°C a aproximadamente 34°C. Se pueden añadir inductores químicos de la producción de proteínas tales como, por ejemplo, cafeína, butirato, y hexametileno bisacetamida (HMBA), al mismo tiempo que, antes y/o después de un cambio de temperatura o en lugar de un cambio de temperatura. Si se añaden inductores después de un cambio de

temperatura, se pueden añadir desde una hora a cinco días después del cambio de temperatura, opcionalmente desde uno a dos días después del cambio de temperatura.

5 Las células hospedadoras se pueden cultivar en suspensión o de forma adherente, unidas a un sustrato sólido. Los cultivos de células se pueden establecer en biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, frascos sobre cilindros, frascos agitados, o biorreactores de tanque agitado, con o sin microportadores.

10 Los cultivos de células se pueden operar en modo discontinuo, de alimentación discontinua, continuos, semicontínuos o en perfusión. Las células de mamífero, tales como las células CHO, se pueden cultivar en biorreactores a una pequeña escala de menos de 100 ml a menos a menos de 1000 ml, una escala de tamaño más intermedio con una capacidad de hasta 2,000 litros y a una escala mayor donde la capacidad puede superar los 20,000 litros. Los cultivos a media y gran escala, tales como para la biofabricación a escala clínica o comercial de las proteínas terapéuticas, se pueden mantener durante semanas e incluso meses, mientras que las células producen la una o varias proteínas deseadas.

15 La proteína recombinante expresada resultante se puede recoger después del medio de cultivo de células. Los métodos para recoger proteínas de la suspensión de células son conocido en la técnica e incluyen, aunque no de forma limitativa, precipitación con ácido, sedimentación acelerada tal como floculación, separación por gravedad, centrifugación, separación por ondas acústicas, filtración incluida la filtración con membranas usando ultrafiltros, microfiltros, filtros de flujo tangencial, filtros de flujo tangencial alternativo, filtros de lecho profundo y filtros de lecho en aluvión. Las proteínas recombinantes expresadas por los procariotas se recuperan a partir de cuerpos de inclusión en el citoplasma mediante procesos que incorporan procesos de plegado rédox conocidos en la materia.

20 La proteína recogida después se puede purificar, o purificar parcialmente, de las impurezas tales como medio de cultivo de células remanente, extractos celulares, componentes no deseados, proteínas de las células hospedadoras, proteínas incorrectamente expresadas y similares, usando una o más operaciones unitarias. El término "operación unitaria" se refiere a una etapa funcional que se realiza como parte del proceso de purificar una proteína recombinante de interés. Por ejemplo, una operación unitaria puede incluir etapas tales como, aunque no de forma limitativa, capturar, purificar, afinar, inactivación vírica, filtración de virus, concentración y/o formulación de la proteína recombinante de interés. Las operaciones unitarias se pueden diseñar para activar un único objetivo o múltiples objetivos, tales como etapas de captura e inactivación de virus. Las operaciones unitarias también pueden incluir etapas de mantenimiento o almacenamiento entre etapas de procesamiento.

30 Una operación unitaria de captura puede incluir una cromatografía de captura que utiliza resinas y/o membranas que contienen agentes que se unen a la proteína recombinante de interés, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de afinidad de metal hidrofobado (IMAC), y similares. Dichos materiales son conocidos en la materia y están comercialmente disponibles. La cromatografía de afinidad, por ejemplo, puede usar elementos de captura de fragmento de unión a anticuerpo o antígeno, tales como la unión a Proteína A, Proteína G, Proteína A/G, Proteína L. La proteína recombinante de interés se puede marcar con una etiqueta de polihistidina y posteriormente purificarse a partir de IMAC usando imidazol o un epítipo tal como FLAG<sup>®</sup> y posteriormente purificarse usando un anticuerpo específico dirigido contra dicho epítipo.

40 Las operaciones unitarias que comprenden la inactivación, reducción y/o eliminación de contaminantes víricos pueden incluir procesos que manipulan en el entorno y/o filtración. Un método para conseguir la inactivación de los virus es la incubación a pH bajo (por ejemplo, pH<4) u otras condiciones de solución, tales como la temperatura o la composición química, para conseguir la inactivación de los virus. La inactivación de virus a pH bajo puede ir seguida de una operación unitaria de neutralización que reajusta la solución con virus inactivados a un pH más compatible con los requisitos de las siguientes operaciones unitarias. También puede ir seguida de filtración, tal como una filtración en lecho profundo, para eliminar la posible turbidez o precipitación resultantes. La filtración de los virus se puede llevar a cabo utilizando microfiltros o nanofiltros, tales como los comercializados por Asahi Kasei (Plavona<sup>®</sup>) y EDM Millipore (VPro<sup>®</sup>).

50 Una operación unitaria de afinado puede aplicar varios métodos cromatográficos para la purificación de la proteína de interés y el aclaramiento de contaminantes e impurezas tales como ADN, proteínas de la célula hospedadora, eliminación de impurezas específicas de producto, variantes de productos y agregados, adsorción de virus y similares. La operación unitaria de cromatografía de afinado aplica resinas y/o membranas que contienen agentes que se pueden usar bien en "modo flujo pistón" (donde la proteína de interés está contenida en el eluyente y los contaminantes y las impurezas quedan unidas al medio de cromatografía) o en "modo de unión y elución", donde la proteína de interés queda unida el método de cromatografía y se eluya después de que los contaminantes e impurezas hayan fluido a su través o se hayan eliminado por lavado del medio de cromatografía. Los ejemplos de dichos métodos de cromatografía incluyen cromatografía de intercambio iónico (IEX), tal como cromatografía de intercambio aniónico (AEX) y cromatografía de intercambio catiónico (CEX); cromatografía de interacción hidrófoba (HIC); cromatografía mixta modal o multimodal (MM), cromatografía de hidroxapatito (HA); cromatografía de fase invertida y filtración en gel, por nombrar algunos.

La concentración de producto y el intercambio con tampón de la proteína de interés en un tampón de formulación deseado para el almacenamiento a granel de la sustancia farmacológica se puede llevar a cabo mediante ultrafiltración y diafiltración.

5 Los atributos y parámetros de rendimiento críticos se pueden medir para orientar mejor las decisiones relativas al comportamiento de cada etapa durante la fabricación. Estos atributos y parámetros críticos se pueden monitorizar en tiempo real, tiempo casi real, y/o después del hecho. Se pueden medir parámetros críticos tales como los componentes del medio consumidos (tales como glucosa) niveles de subproductos metabólicos (tales como lactato y amoníaco) que se acumulan, así como los relacionados con el mantenimiento y supervivencia celular, tales como el contenido de oxígeno disuelto. Los atributos críticos tales como la productividad específica, densidad de células viables, pH, osmolalidad, aspecto, color, agregación, rendimiento porcentual y título se pueden monitorizar durante y después del proceso. La monitorización y las mediciones se pueden realizar usando técnicas conocidas y equipos comerciales.

10 El título se puede medir utilizando métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, el título se puede medir por análisis de HPLC en fase invertida usando cromatografía de afinidad, donde la Proteína A se inmoviliza en un soporte de columna. A un pH neutro, las moléculas de anticuerpo se unen a la proteína A a través de la región Fc a la vez que las proteínas de la célula hospedadora, los componentes del medio acondicionado y el tampón se eluyen desde la columna en la dirección del flujo. Los anticuerpos capturados se eluyen a pH ácido y se detectan mediante absorbancia UV a 280 nm. Se puede derivar una curva de calibración de un patrón de anticuerpo universal y las áreas de los picos correspondientes usando un análisis de regresión lineal. A continuación se calculan las concentraciones del anticuerpo en las muestras de ensayo a partir de la curva de calibración y la relación de los coeficientes de extinción a partir del patrón de anticuerpo universal y el anticuerpo de ensayo.

15 Otros métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, ELISA; HTRF (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo) (Cisbio US, Bedford, MA); y la plataforma Berkley Lights Beacon (Emeryville, CA).

20 También se describen composiciones que comprenden una proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora cotransfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac. Dichas composiciones farmacéuticas incluyen una proteína de interés o las células que expresan una proteína de interés, tales como una célula inmunitaria que expresa los CAR y los TCR, junto con uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes.

25 Las composiciones farmacéuticas (soluciones, suspensiones o similares) pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono- o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como el cloruro de sodio o la dextrosa. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

30 En un aspecto, la descripción describe un método para mejorar el título de una proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora que comprende modificar genéticamente la molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora; cotransfectar una célula hospedadora con la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y con un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac, y cultivar las células para expresar la proteína recombinante de interés, en el que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada genéticamente se mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora transfectada por una transposasa piggyBac natural o nada de transposasa piggyBac. En un aspecto relacionado, la célula hospedadora se transfecta con un primer vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y un segundo vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto relacionado, la célula hospedadora se transfecta con un único vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO:18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la

5  
10  
15

secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:18.

20  
25  
30  
35  
40  
45

En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

50  
55  
60

En un aspecto, la descripción describe un método para aumentar la producción de proteínas recombinantes en un cultivo de células de mamífero que expresan una proteína recombinante que comprende establecer un cultivo de células en un biorreactor usando una célula hospedadora que se ha cotransfectado con una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida de un transposón piggyBac; y expresar la proteína recombinante de interés; en el que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada genéticamente se mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con una transposasa piggyBac natural o nada de transposasa piggyBac. En un aspecto relacionado, la célula hospedadora se transfecta con un primer vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y un segundo vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto relacionado, la célula hospedadora se transfecta con un único vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO:18.

5 En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:18.

20 En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

50 En un aspecto, la descripción describe un método para producir una proteína recombinante de interés aislada y purificada, que comprende establecer un cultivo de células en un biorreactor con una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante de interés, en el que la línea de células se ha cotransfectado con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una transposasa piggyBac modificada genéticamente para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac; cultivar las células para expresar la proteína recombinante de interés; recoger la proteína recombinante de interés, procesar la proteína recombinante de interés mediante una o más operaciones unitarias, y obtener una proteína recombinante de interés aislada y purificada. En un aspecto relacionado, la célula hospedadora se transfecta con un primer vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y un segundo vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto relacionado, la célula hospedadora se transfecta con un único vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. En un aspecto relacionado, la al menos una operación unitaria es una etapa de cromatografía de captura seleccionada entre cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía

de intercambio catiónico, cromatografía multimodal, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxapatito. En otro aspecto, al menos una operación unitaria es una etapa de cromatografía de afinado seleccionada entre cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía multimodal, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxapatito. En otro aspecto, al menos una operación unitaria se selecciona entre inactivación de virus, filtración de virus, filtración en lecho profundo, y UF/DF. En un aspecto relacionado, el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada genéticamente se mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula transfectada hospedadora con una transposasa piggyBac natural o nada de transposasa piggyBac. En otro aspecto, se describe una proteína recombinante de interés aislada y purificada producida según el método. En otro aspecto, se describe una composición farmacéutica que comprende la proteína de interés aislada. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 18.

En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 18.

En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

En un aspecto, la descripción describe un kit para transfectar una célula que comprende un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una transposasa piggyBac modificada genéticamente para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora; y un vector que comprende al menos los elementos de repetición invertida

mínima de un transposón piggyBac en el que se ha introducido la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO:18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:18.

En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

Las transposasas piggyBac descritas aquí se pueden usar como parte de un sistema transposón a piggyBac para la transferencia génica; líneas celulares de producción; aplicaciones relacionadas con la ingeniería genética tales como para modificar genéticamente las células, generar modificaciones genómicas, uso en mutagénesis de la línea germinal o somáticas; uso en la mediación de la transferencia génica; caracterización de genes; determinación de las funciones de los genes; cribado de oncogenes; terapia génica; generación de citoblastos pluripotentes; y animales transgénicos no humanos (véanse por ejemplo los documentos US 2013/0209426; US 2010/0311116; Vanden Driessche et al., Blood 114 (8): 1461-1468, 2009; Yusa K, et al., Nat. Methods. 6(5):363-369, 2009; Wilson et al., Mol. Ther. 15(1):139-145, 2007; Landrette et al., PLoS ONE 6(10): 1-12, 2011; Nakanishi et al., Molecular Therapy 18(4): 707-714, 2010); Zhao et al., Transl Lung Cancer Res., 5(1):120-125, 2016; Wilson et al., Molecular Therapy 15(1): 139-145, 2007).

Las transposasas piggyBac descritas aquí se pueden usar en edición del genoma. Las transposasas piggyBac descritas aquí se pueden usar como parte del sistema transposón/transposasa piggyBac que es ventajoso porque

ofrece una administración no vírica eficaz para su integración en tipos de células primarias o en citoblastos. Las transposasas piggyBac descritas aquí se pueden usar para permitir la administración no vírica de genes que codifican receptores de antígeno quiméricos (CAR), cadenas alfa y beta de receptores de linfocitos T (TCR), así como otros genes que codifican proteínas tales como citocinas, inhibidores del punto de control, y otras proteínas para modificar células genéticamente. Se pueden administrar múltiples genes en una única construcción genética. La ventaja respecto de la transducción vírica es la mayor carga de genes que se puede incorporar, y la transposasa aumenta la eficacia de la integración en una transfección no vírica. Dicho sistema también se puede usar junto con otras tecnologías de edición del genoma no víricas, tales como las nucleasas de dedo de cinc (ZFN), nucleasas análogas al activador de la transcripción (TALEN), repeticiones palindrómicas cortas intercaladas regularmente - (CRISPR-) asociadas a proteína 9 (Cas9), integrasas tales como la integrasa de fase PhiC3, efectores análogos al activador de la transcripción (TALES), recombinasas específicas de secuencia, y otros sistemas de transposón/transposasa, tales como el Sleeping Beauty, para permitir la transducción en una amplia variedad de células (documentos 2015/0031132; WO2018/098671; Ivics et al., *Cell* 91(4): 501-510, 1997; Boch et al., *Science* 326(5959): 1509-1512, 2009; Christian et al., *Genetics* 186(2): 757-761, 2010; Wilber et al., *Stem Cells Int*; Vol: 2011: Número de artículo 717069, 2011; Yusa et al., *Nature* 478, 20 Octubre, 391-396, 2011; Silva et al., *Curr Gene Ther* 11(1): 11-27, 2011; Cong et al., *Science* 339(6121): 819-823, 2013; Mali et al., *Science* 339(6121): 823-826, 2013. Li et al., *Molecular Therapy: Nucleic Acids* Vol. 8 Septiembre, 64-76, 2017; e Ishida et al., *www.nature/Scientific Reports* 8, Número de artículo 310, 2018).

Las transposasas piggyBac descritas aquí se pueden usar como parte del sistema transposón piggyBac para transfectar células de forma estable no víricamente con construcciones génicas que codifican CAR, TCR y/u otras proteínas. Los linfocitos T se pueden (i) retirar de un paciente (sujeto) o donante, (ii) modificar genéticamente, usando un sistema transposón/transposasa piggyBac que comprende las transposasas piggyBac descritas aquí, para expresar uno o más receptores de antígeno quiméricos, receptores de linfocitos T, y/u otras proteínas que se unen a al menos un antígeno de interés, (iii) expandirse mediante cultivo celular a población más grande de linfocitos T modificados genéticamente, y (iv) reintroducirlos en el paciente. Después de que los linfocitos T modificados por ingeniería genética se reintroduzcan en el paciente, median una respuesta inmunitaria contra las células que expresan el antígeno. Véanse por ejemplo las patentes de Estados Unidos con números 7,741,465 y 6,319,494; la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2017/0355957; Nakazawa et al., *J. Immunotherapy* 32(8): 826-836; 2009; Nakazawa et al., *Molecular Therapy* 19(12): 2133-2143, 2011; Eshhar et al. *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136; Finney et al., *Journal of Immunology*, 161: 2791-2797, 1998; Krause et al., *J. Exp. Med.*, 188(4): 619-626, 1998; Esta respuesta inmunitaria incluye la secreción de IL-2 y otras citocinas desde los linfocitos T, la expansión clonal de los linfocitos T que reconocen el antígeno y la destrucción específica mediada por células T de células positivas para la diana. Véase Hombach et al., *Journal of Immunol.* 167: 6123-6131 (2001).

Las células inmunitarias se pueden obtener de un sujeto. En algunos aspectos, las células inmunitarias comprenden linfocitos T. Las células T pueden obtenerse de varias fuentes, incluidas células mononucleares de sangre periférica (PBMC), médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinados aspectos, los linfocitos T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recogida del sujeto usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por el experto en la materia, tales como la separación con FICOLL™. Las células pueden obtenerse preferentemente de la sangre en circulación de un individuo mediante aféresis. El producto de la aféresis contiene normalmente linfocitos, incluidos linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En determinados aspectos, las células recogidas mediante aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción plasmática y colocarse en un tampón o medio apropiado para su posterior procesamiento. Las células se pueden lavar con PBS. Como se apreciará, se puede usar una etapa de lavado, tal como mediante el uso de una centrífuga de flujo semiautomático, por ejemplo, el procesador de células Cobe™ 2991, el Baxter CytoMate™ o similares. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, u otra solución salina con o sin tampón. En determinados aspectos, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden eliminarse.

En determinados aspectos, los linfocitos T se aíslan de las PBMC mediante el lisado de los glóbulos rojos y el agotamiento de los monocitos, por ejemplo, usando centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Una subpoblación específica de linfocitos T, tales como los linfocitos T CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> y CD45RO<sup>+</sup> se pueden aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa conocidas en la materia. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de linfocitos T por selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método para su uso en el presente documento es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer los linfocitos CD4<sup>+</sup> por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales incluye normalmente anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. La citometría de flujo y la clasificación de células también se pueden usar para aislar poblaciones de células de interés para su uso en la presente descripción.

Las PBMC se pueden usar directamente para la modificación genética con las células inmunitarias (como los CAR o TCR) utilizando los métodos descritos aquí. En determinados aspectos, después de aislar las PBMC, los linfocitos T pueden aislarse aún más y tanto los linfocitos T citotóxicos como los auxiliares pueden clasificarse en subpoblaciones

de linfocitos T sin exposición previa, de memoria y efectores antes o después de la modificación genética y/o expansión.

5 En algunos aspectos, los linfocitos CD8<sup>+</sup> se clasifican además en células sin exposición previa, de memoria central y efectores mediante la identificación de antígenos de la superficie celular que están asociados con cada uno de estos tipos de células CD8<sup>+</sup>. En algunos aspectos, la expresión de marcadores fenotípicos de linfocitos T de memoria central incluye CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativos para granzima B. En algunos aspectos, los linfocitos T de memoria central son linfocitos T CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>. En algunos aspectos, los linfocitos T efectores son negativos para CD62L, CCR7, CD28 y CD 127, y positivos para granzima B y perforina. En determinados aspectos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se clasifican además en subpoblaciones. Por ejemplo, los linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> se pueden clasificar en células sin exposición previa, memoria central y efectores mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de la superficie celular.

15 Las células inmunitarias, tales como los linfocitos T, se pueden modificar genéticamente después de su aislamiento usando uno o más vectores que comprenden una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más CAR y las transposasas piggyBac descritas aquí como parte de un sistema transposón/transposasa piggyBac. Las células inmunitarias modificadas genéticamente de forma no vírica se pueden obtener transfectando las células con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí y al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos un CAR, TCR, y/u otra proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. Las células inmunitarias modificadas genéticamente también se pueden obtener cotransfectando las células inmunitarias con un primer vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí y con un segundo vector que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos un CAR, TCR, y/u otra proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. Los vectores se pueden introducir en la célula hospedadora usando cualesquiera métodos conocidos en la materia, tales como mediante electroporación o nucleofección. En un aspecto adicional, se puede usar una mezcla de diferentes vectores de expresión para modificar genéticamente una población donante de células efectoras inmunitarias en la que cada vector codifica un CAR, TCR diferente, y/u otra proteína de interés. Las células efectoras inmunitarias transformadas resultantes forman una población mixta de células modificadas genéticamente, con una proporción de las células modificadas genéticamente que expresan más de un CAR, TCR diferente, y/u otra proteína de interés.

20 También se incluyen genes suicidas que permiten la eliminación selectiva de las células modificadas tras la administración del profármaco, codificando las enzimas que producen productos tóxicos funcionales activos que favorecen la activación de la apoptosis o inhibir la proliferación celular, para minimizar los eventos adversos. También se puede incluir un interruptor inducible "de encendido" o "acelerador". Las técnicas adecuadas incluyen el uso de caspasa-9 inducible (solicitud de publicada de Estados Unidos 2011/0286980) o una timidina quinasa, antes, después o al mismo tiempo, cuando las células se transfectan con la construcción CAR o TCR. Los métodos adicionales para introducir genes suicidas y/o interruptores "de encendido" incluyen TALENS, dedos de zinc, ARNi, ARNip, ARNhc, tecnología antisentido y otras técnicas conocidas en la materia.

30 Las células inmunitarias se pueden activar y expandir (o diferenciar en el caso de precursores) *in vitro* antes de modificarse genéticamente. Los métodos para activar y expandir los linfocitos T son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6,905,874; la patente de EE.UU. N.º 6,867,041; la patente de EE.UU. N.º 6,797,514; y el documento PCT WO2012/079000, cuyo contenido se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. En general, dichos métodos incluyen poner en contacto PBMC o linfocitos T aislados con un agente estimulante y un agente coestimulador, tal como los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas apropiadas, tal como IL-2. Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma perla sirven como una célula presentadora de antígeno (APC) "sustituta". Un ejemplo es el sistema Dynabeads®, un sistema estimulador/activador de CD3/CD28 para la activación fisiológica de linfocitos T humanos.

35 En otros aspectos, los linfocitos T pueden activarse y estimularse para proliferar con células alimentadoras y anticuerpos y citocinas apropiadas usando métodos tales como los descritos en la patente de EE.UU. n.º 6,040,177; la patente de EE.UU. n.º 5,827,642; y el documento WO2012129514.

40 Las PBMC pueden incluir además otros linfocitos citotóxicos tales como los linfocitos NK, los linfocitos NKT o los citoblastos hematopoyéticos. Un vector de expresión que lleva la secuencia codificante de un receptor quimérico como se describe aquí se puede introducir en una población de linfocitos T humanos del donante, linfocitos NK, linfocitos NKT, monocitos o citoblastos hematopoyéticos.

45 Se utilizan procedimientos convencionales para la criopreservación de linfocitos T que expresan CAR o TCT para su almacenamiento y/o preparación para su uso en un sujeto humano. Esto implica la criopreservación de las células inmunitarias de modo que las células permanezcan viables al descongelarse. Una fracción de las células inmunitarias que expresan los CAR se puede criopreservar por métodos conocidos en la técnica para proporcionar una fuente permanente de dichas células para el tratamiento futuro de pacientes afectados por una neoplasia maligna. Cuando

sea necesario, las células inmunitarias transformadas crioconservadas pueden descongelarse, crecer y expandirse para más células de este tipo.

Como se usa aquí, "crioconservación" se refiere a la preservación de las células mediante el enfriamiento a temperaturas bajo cero, como (normalmente) 77 Kelvin o -196 °C. Los agentes crioprotectores se usan a menudo a temperaturas bajo cero para evitar que las células preservadas se dañen debido a la congelación a bajas temperaturas o al calentamiento a temperatura ambiente. Los agentes crioprotectores y las velocidades de enfriamiento óptimas pueden proteger contra el daño celular y son conocidos en la técnica. Los agentes crioprotectores incluyen, aunque no de forma limitativa, dimetil sulfóxido (DMSO) (Lovelock & Bishop, Nature (1959); 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature (1961); 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci. (1960); 85: 576), y polietilenglicol (Sloviter & Ravdin, Nature (1962); 196: 48).

Las células se formulan a continuación para su reintroducción en el sujeto. Las células se formulan mediante su recogida primero de su medio de cultivo, y posterior lavado y concentración de las células en un medio y un sistema de recipiente adecuado para la administración (un transportador "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. Los medios de infusión adecuados pueden ser cualquier formulación de medio isotónico, típicamente solución salina normal, Normosol™ R (Abbott) o Plasma-Lyte™ A (Baxter), pero también puede utilizarse dextrosa al 5 % en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión se puede complementar con seroalbúmina humana.

Las cantidades de tratamiento deseadas de las células en la composición son generalmente al menos 2 células (por ejemplo, al menos 1 linfocitos T de memoria central CD8<sup>+</sup> y al menos 1 subgrupo de linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>) o típicamente es mayor de 10<sup>2</sup> células, y hasta 10<sup>6</sup>, hasta e incluyendo 10<sup>8</sup> o 10<sup>9</sup> células y pueden ser más de 10<sup>10</sup> células. El número de células dependerá del uso deseado para el que se destine la composición y el tipo de células incluidas en la misma. Las células pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas para el paciente que recibe la terapia.

Las poblaciones de células que expresan CAR, TCR, y/u otras proteínas de interés de la presente invención pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica junto con diluyentes y/o otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares.

Se describen métodos para usar las células modificadas genéticamente para tratar dolencias, enfermedades o trastornos. Dichas dolencias, enfermedades o trastornos que incluyen cánceres, tumores, tumores sólidos, trastornos hematológicos, leucemia, linfomas, infecciones víricas, enfermedades o trastornos inflamatorios, y/o enfermedad o trastornos autoinmunitarios. En algunos aspectos, la descripción se refiere a crear una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de las células inmunitarias modificadas genéticamente de la presente solicitud al sujeto. En algunos aspectos, la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T se dirige contra una célula o células diana. En algunos aspectos, la célula inmunitaria modificada genéticamente comprende una construcción genética que expresa uno o más receptores de antígeno quimérico (CAR), receptores de linfocitos T (TCR) y/u otras proteínas de interés. En algunos aspectos, la célula diana es una célula tumoral. En algunos aspectos, la descripción comprende un método para tratar o prevenir una neoplasia maligna, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de al menos una molécula de unión a antígeno aislada descrita aquí. En algunos aspectos, la descripción comprende un método para tratar o prevenir una neoplasia, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de al menos una célula inmunitaria, en el que la célula inmunitaria comprende al menos un receptor de antígeno quimérico, un receptor de linfocitos T y/o una molécula de unión a antígeno aislada como se describe aquí. En algunos aspectos, la descripción comprende un método para tratar o prevenir trastornos inflamatorios y/o autoinmunitarios. La descripción también describe el uso de métodos para respaldar procedimientos de trasplante, tales como en terapia celular dirigida contra moléculas HLA con emparejamientos incorrectos en el tejido/órgano transplantado. En algunos aspectos, la célula diana es un islote pancreático.

Se describe aquí un método para generar células modificadas genéticamente de forma no vírica, que comprende (a) establecer un vector que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de una transposasa piggyBac; (b) aislar las células inmunitarias naturales procedentes de un donante o sujeto; (b) cotransfectar las células con la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y con el vector que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac; y (c) expandir las células mediante cultivo celular a una población más grande de células modificadas genéticamente de forma no vírica. En un aspecto, las células se transfectan con el vector que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac, y un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una transposasa piggyBac modificada genéticamente para aumentar la estabilidad en una célula. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, las células se transfectan con un vector que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac, y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una transposasa piggyBac modificada genéticamente para aumentar la estabilidad en una célula. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico

modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO:18.

5 En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18.

10 En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:18.

20

En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En una realización relacionada, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

25

30

35

40

45

50

En un aspecto, la descripción describe una célula modificada genéticamente no viral para uso en un método para tratar un sujeto, que comprende (a) modificar genéticamente la molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac para aumentar la estabilidad en una célula e introducirla en un vector; (b) aislar células inmunitarias naturales de un sujeto o donante; (c) cotransfectar las células con la molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y con un vector que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac; (d) expandir las células mediante cultivo celular a una población más grande de células modificadas genéticamente; (e) aislar las células transformadas del cultivo celular para obtener una población de células que comprende las células modificadas genéticamente; y (f) reintroducir las células modificadas genéticamente de forma no vírica en el sujeto. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO:18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO:

55

60

7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 13, o la SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o la SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac codificada mediante la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:18.

En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones 147, 176, 221, 247, 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de aminoácidos de leucina en lugar de la isoleucina en una o más de las posiciones 147, 176, 221, y 247 y/o una sustitución de aminoácidos de treonina en lugar de serina en una o más de las posiciones 429, 533, y 573 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una leucina en lugar de la isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, y una treonina en lugar de la serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En otro aspecto relacionado, la transposasa piggyBac comprende una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO:2, una sustitución de leucina en lugar de isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO:2, una sustitución de treonina en lugar de serina en la posición 533 de SEQ ID NO:2. En un aspecto, se describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, o la SEQ ID NO: 16. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro aspecto, la descripción describe una transposasa piggyBac que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

En un aspecto relacionado, la célula inmunitaria natural es una célula mononuclear. En un aspecto relacionado, la célula inmunitaria natural es un linfocito T. En otro aspecto, la proteína de interés es un receptor de antígenos, un receptor de linfocitos T, o un receptor de antígeno quimérico. En otro aspecto, la célula también se transfecta con una molécula de ácido nucleico que codifica un gen suicida, uno inducible en o sobre un interruptor de aceleración, o ambos. En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una transposasa piggyBac como se describe aquí.

En un aspecto, las células inmunitarias naturales se transfectan con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y un vector que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de una transposasa piggyBac.

En un aspecto, las células inmunitarias naturales se transfectan con un único vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica la transposasa piggyBac y al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de una transposasa piggyBac.

En un aspecto, el vector incluye construcciones bicistrónicas o multicistrónicas que codifican múltiples proteínas de interés.

La descripción también describe células modificadas genéticamente de forma no vírica, poblaciones de células o cultivos de células realizados de acuerdo con los métodos descritos aquí. También se describe una formulación que comprende las células modificadas genéticamente o poblaciones de células realizadas según los métodos descritos aquí.

5 También se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un donante o sujeto que lo necesita que comprende administrar al donante o sujeto una cantidad eficaz de las células modificadas genéticamente o poblaciones de células realizadas según los métodos descritos aquí. Se describe aquí una composición farmacéutica que comprende la proteína de interés aislada y purificada realizada de acuerdo con los métodos descritos aquí.

10 Aunque la terminología usada en esta solicitud es convencional en la técnica, se describen aquí definiciones de determinados términos para asegurar la claridad y la precisión de los significados de las reivindicaciones. Las unidades, prefijos, y símbolos pueden denotarse en su forma aceptada en el SI. Los intervalos numéricos enumerados en el presente documento son inclusivos de los números que definen el intervalo e incluyen y apoyan cada número entero en el intervalo definido. Los métodos y técnicas descritos aquí se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la materia y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y se describen a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique de otra manera. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Lo que se describe en un aspecto o aspecto de la descripción puede combinarse con otros aspectos y/o aspectos de la descripción.

15 La presente invención no está limitada en el alcance por las realizaciones específicas descritas aquí que se pretenden como ilustraciones sencillas de aspectos individuales de la invención, y los métodos y componente funcionalmente equivalentes están comprendidos en el alcance de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las que se muestran y describen en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la anterior descripción y los dibujos acompañantes. Se pretende que dichas modificaciones estén comprendidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1 Identificación y ensayo de mutaciones**

30 No se conoce todavía la estructura de la transposasa piggyBac y otras transposasas relacionadas. Los inventores predijeron los motivos de la estructura secundaria de la transposasa piggyBac de *Trichoplusia ni* natural (SEQ ID NO: 2) usando un método *in silico* denominado DSC (King, RD et al., *Protein Sci.* 5(11): 2298-2310, 1996). Véase la Figura 1. Los inventores encontraron que la transposasa *iggyBac* es principalmente una proteína de alfa-hélice. Los inventores imaginaron mutaciones que podían estabilizar las alfa-hélices que pueden mejorar la estabilidad global de la transposasa y que pueden tener a la vez un impacto positivo sobre la expresión de la transposasa. Los inventores identificaron I147, I176, I221, I247 como restos que podría mutarse potencialmente para mejorar la estabilidad de las alfa-hélices de la transposasa piggyBac.

35 Los inventores identificaron también posibles sitios de glicosilación unidos a N (es decir, motivo NXS/T) en la secuencia de la transposasa. Debido, en general a que el motivo NXT experimenta una glicosilación más completa en comparación con el motivo NXS, los inventores supusieron que la mutación del motivo NXS por el motivo NXT puede mejorar la glicosilación global en piggyBac que a su vez puede mejorar la estabilidad de la transposasa. Se diseñaron mutaciones Ser a Thr en los siguientes sitios de glicosilación unidos a N, N427ES, N531IS y N571AS. El sitio N531IS está presente en un sitio hidrófobo y por tanto puede conferir la mejora de estabilidad más grande tras la glicosilación mejorada. Se desconoce actualmente si la transposasa piggyBac está glicosilada o si esta se requiere para la activación.

40 Se generó un total de ocho plásmidos que incluían una secuencia de ácidos nucleicos que codificaba la transposasa *iggyBac* natural y siete transposasas con secuencias de ácidos nucleicos que codificaban mutaciones simples, dobles o triples (véase la Tabla 3). Los plásmidos de transposasa clonada compartían los mismos codones de ADN excepto para las secuencias mutadas. Los plásmidos de transposasa se transformaron en una línea de células y se repicaron las colonias, se escalaron y se confirmaron las secuencias.

50 Tabla 3

SEQ ID NO		Mutación
ADN	Proteína	
1	2	Transposasa piggyBac de <i>Trichoplusia ni</i> WT

3	4	I147L isoleucina a leucina
5	6	I247L isoleucina a leucina
7	8	S533T serina a treonina
9	10	LLT (I247L I147L S533T)
11	12	ILT (I247 I147L S533T)
13	14	LIT (I247L I147 S533T)
15	16	LLS (I247L I147L S533)

5 Se ensayaron cuatro proteínas de interés, dos anticuerpos monoclonales (AB1 y AB2), una proteína de fusión, y un activador de linfocitos T biespecíficos. Cada gen que codifica una proteína de interés se clonó en un plásmido separado que comprende al menos los elementos de repetición invertida en 5' y 3' de un transposón piggyBac. Estos cuatro plásmidos se escalaron y se confirmaron las secuencias.

10 Los plásmidos de transposasa mutados circulares se cotransfectaron junto con uno de los plásmidos circulares que contenían el gen que codificaba una de las cuatro proteínas, en las células CHO inactivadas génicamente para la glutamina sintasa usando electroporación. La relación de transposasa a proteína de plásmido de interés era 1:4. Las células se dejaron recuperar en medio suplementado con glutamina durante tres días a 36°C y CO<sub>2</sub> al 5% antes de cambiar al medio selectivo sin glutamina. Las células se pasaron cada 3 a 4 días en medio selectivo a 36°C y CO<sub>2</sub> al 5% hasta que recuperaron > 90% de viabilidad.

15 Se llevó a cabo una producción con alimentación discontinua con placas de 24 pocillos de profundidad para evaluar la expresión de la proteína expresada a partir de las líneas de células estables. Se sembraron los cultivos a 1x10<sup>6</sup> células/ml en un medio de producción basal sin glutamina, y se alimentaron nutrientes adicionales en los días 3, 6, y 8. Los cultivos se recogieron en el día 10 y los sobrenadantes se analizaron para determinar la titulación.

20 Se midió la titulación mediante cromatografía UPLC de afinidad en la que la proteína A se inmovilizó en el soporte de la columna a una carga diana de 20 ug. A un pH neutro, la proteína en la muestra de ensayo se une a la proteína A a través de la región Fc a la vez que las proteínas de la célula hospedadora, los componentes del medio acondicionado y el tampón se eluyeron desde la columna en la dirección del flujo. La proteína capturada se eluyó a pH 1.9 ácido 1X DPBS y se detectó mediante absorbancia UV a 280 nm. Se derivó una curva de calibración de un patrón de anticuerpo universal y las áreas de los picos correspondientes usando un análisis de regresión lineal. A continuación se calcularon las concentraciones de proteínas en las muestras de ensayo a partir de la curva de calibración y la relación de los coeficientes de extinción a partir del patrón de anticuerpo universal y la muestra de ensayo.

25 El uso de transposasas mutadas mostró un título mejorado o similar al de la transposasa WT o los controles carecen de una transposasa para los anticuerpos monoclonales y las proteínas de fusión ensayadas. Los activadores de linfocitos T biespecíficos tienen en general títulos más bajos que los de los anticuerpos monoclonales y no se expresan generalmente a altos niveles cuando se usan también en este sistema. Es posible para esta molécula concreta, que la expresión cuello de botella no esté asociada con la transcripción del sitio de integración del gen, sino en su lugar, un cuello de botella de la secreción de la proteína. Otros activadores de linfocitos T biespecíficos pueden tener diferentes resultados si no tienen los mismos estímulos en la expresión, de tal manera que es probable que utilizar un estructura principal diferente con moléculas activadoras de linfocitos T biespecíficos de como resultado mejores títulos.

**Ejemplo 2 Expresión de mutantes de transposasa dobles y triples en células hospedadoras GS KO con la adición de MSX**

35 Se transfectaron células CHO inactivadas génicamente para la glutamina sintasa (células GSKO) utilizando la electroporación (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), con plásmidos circulares que codifican 1) del mutante doble, ADN de la transposasa piggyBac "ILT" (ITR, SEQ ID NO: 11), 2) el mutante triple, "LLT", ADN de la transposasa piggyBac (LLT, SEQ ID NO: 9), y 3) la transposasa no de piggyBac (ninguna), todas en combinación con un plásmido circular que contiene el gen de interés y los elementos de repetición invertida en 5' y 3' del transposón piggyBac de *Trichoplusia ni*. Se ensayaron tres genes de interés, un enlazador heteroFc de linfocitos T biespecíficos, un IgG-scFv, y un anticuerpo monoclonal (mAb).

40 Se añadió metionina sulfoximina (MSX) (EDM Millipore, Burlington, MA), 25µM, 3 días después de la transfección (25) tras la recuperación del combinado inicial con una viabilidad >90% (0-25), o no en todos (0). La adición de metionina sulfoximina (MSX), un inhibidor de la glutamina sintetasa, se usó para aumentar la expresión de un gen de interés en líneas de células GSKO CHO.

Una vez que las células tratadas con MSX recuperadas se sometieron a una producción de alimentación discontinua a pequeña escala en placas de 24 pocillos profundos o tubos de centrífuga para evaluar la expresión de la proteína expresada a partir de las líneas de células estables. Se sembraron los cultivos a  $1 \times 10^6$  células/ml en un medio de producción basal sin glutamina, y se alimentaron nutrientes adicionales en los días 3, 6, y 8. Los cultivos se recogieron en el día 10 y se analizaron los sobrenadantes para determinar la titulación, como se describe en el Ejemplo 1.

Las combinaciones transfectadas con una transposasa mutante (ILT o LLT) mostraron un aumento en la expresión en comparación con aquellas combinaciones de transposasas que no recibieron tratamiento con MSX (MSX 0  $\mu$ M). Para las combinaciones a las que no se añadió transposasa (ninguna), la expresión no aumentó con la adición de MSX.

El transposón imparte un mecanismo semidirigido de transfección que se dirige a la cromatina abierta, que son las áreas de transcripción activa en el genoma. Cuando el transposón se integra en combinación con la transposasa, se integra la secuencia completa del vector entre los elementos de repetición invertida en 5' y 3' del transposón. La transfección del transposón sin la transposasa da como resultado la integración aleatoria en el cromosoma, y como resultado, la secuencia completa del vector entre los elementos de repetición invertida 5' y 3' del transposón puede no estar integrada en un sitio activo. Además, sin la transposasa, la integración completa no está garantizada, lo que puede conducir a una desconexión entre el gen de interés y el marcador de selección (en este caso, glutamina sintasa), y como tal, MSX podría no alterar la expresión del gen de interés.

En el contexto del sistema de vector ensayado, la transposasa diseñada mediante ingeniería genética tiene la ventaja añadida de aumentar la expresión con y sin la adición de MSX en comparación con el control sin transposasa. (Figura 5). El número de copias aumentado de piggyBac puede contribuir también a la selección mejorada con MSX.

### **Ejemplo 3 Transfección con ADN o ARNm de transposasas piggyBac.**

La transposasa que se usa para la integración del gen de interés puede estar basada tanto en ADN como en ARNm. Un riesgo con el uso de una transposasa transcrita con ADN es el potencial del gen de la transposasa de integrarse en el genoma que podría dar como resultado la transcripción/traducción activa de la transposasa en la línea de células transfectada. Esto podría conducir posiblemente a inestabilidad genómica debido a la actividad transposasa en sitios de reconocimiento de la transposasa potencialmente crípticos. Una alternativa es usar un ARNm para la transfección debido a que no se integra en el genoma.

Una transcrita de ARNm sin modificar que utiliza bases naturales, así como un transcrita de ARNm sintético modificado que tiene un 25% de sustituciones de pseudo-U y protegidas con 5-metil-C se prepararon para el mutante doble, "ILT", y el mutante triple, "LLT", de las transposasas piggyBac.

Se llevaron a cabo dos conjuntos de experimentos para evaluar la transposasa traducida a partir del ARNm de la transfección. En el primer experimento, se ensayaron los transcritos de ARNm para el mutante doble de la transposasa piggyBac (ILT, SEQ ID NO:17), y el mutante triple (LLT, SEQ ID NO:18). En el segundo experimento se ensayó un transcrita de ARNm sintético para el mutante doble "ILT" que tiene un 25% de sustituciones de pseudo-U y protegidas con 5-metil-C además del transcrita de ARNm.

Los transcritos de ARNm y ARNm sintético, junto con un plásmido circular que comprende los elementos de repetición invertida en 5' y 3' del transposón piggyBac de *Trichoplusia ni* y un gen que codifica un anticuerpo monoclonal, se transfectaron en una línea de células GSKO, usando tanto electroporación, como un método de transfección basado en lípidos.

Para la electroporación, se añadieron pesos iguales de un vector de ADN de transposasa y transposón linealizados a  $2 \times 10^7$  células suspendidas en medio en una cubeta. La mezcla de ADN celular se electroporó usando un electroporador Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories). A continuación se añadieron las células electroporadas a medio de crecimiento caliente y se incubaron a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 días, tras lo cual, las células se resuspendieron en medio selectivo para establecer combinados estables. Para la transfección de lípidos, el reactivo usado fue Lipofectamina LTX (Gibco/ThermoFisher, Waltham, MA). El día antes de la transfección, las células se sembraron en  $1 \times 10^6$  células/ml agitando en suspensión. En el día de la transfección, las células se sembraron en el medio de transfección en una placa de 6 pocillos. El complejo de ADN de Mab/transposasa/lipofectamina LTX se preparó e incubó. A continuación se añadió el complejo a las células y se incubó durante 5-8 horas. Tras la incubación, se añadió medio de crecimiento, y se dejó que las células se recuperaran durante 2-3 días. Se usó tripsina para desprender las células si estuvieran pegadas y se centrifugaron las células y se resuspendieron en medio selectivo para establecer combinados estables.

Las transfecciones de ARNm se compararon con las condiciones de control, una línea de células GSKO transfectada con el ADN correspondiente que codifica una transposasa. Un plásmido circular que comprende ADN que codifica el mutante doble (ILT, SEQ ID NO:11) o el mutante triple (LLT, SEQ ID NO:9), junto con un plásmido circular que comprende los elementos de repeticiones terminales invertidas en 5' y 3' de un transposón piggyBac de *Trichoplusia ni* que comprende un anticuerpo monoclonal, se transfectaron en las mismas condiciones que el ARNm.

Las cantidades de ARNm y ADN de transposasa, el gen de interés, la relación del gen de interés, el ADN o el ARN a la transposasa, y el número de células transfectadas se variaron para ensayar las condiciones óptimas, Tabla 4.

Tabla 4 Condiciones de electroporación y lipofección.

Transposasa	ADN de Mab (µg)	ADN o ARNm de transposasa (µg)	Relación Mab a transposasa
Experimento 1 Electroporación de 2e7 células hospedadoras			
Control de ADN	20	5	4:1
Ninguna	20	0	
ARNm	20	5	4:1
ARNm	20	10	2:1
ARNm	20	20	1:1
ARNm	14	100	1:7
ARNm	28	200	1:7
Experimento 2 Lipofectamina LXT 1.2e6 células hospedadoras			
Control de ADN	2	0.5	4:1
Control de ADN	2	2	1:1
Control de ADN	4	4	1:1
ARNm	2	0.5	4:1
ARNm	2	2	1:1
ARNm	4	4	1:1
Experimento 3 Electroporación de 2e7 células hospedadoras			
Control de ADN	30	15	2:1
ARNm	30	15	2:1
ARNm sintético	30	15	2:1

5 Las células transfectadas se dejaron recuperar en medio suplementado con glutamina durante tres días a 36°C y CO<sub>2</sub> al 5% antes de cambiar al medio selectivo sin glutamina. Las células se pasaron cada 3 a 4 días en medio selectivo a 36°C y CO<sub>2</sub> al 5% hasta que recuperaron a > 90% de viabilidad y se evaluaron para el título como se ha descrito en el Ejemplo 1.

10 Las transfecciones con ARNm consiguieron niveles de expresión comparables con las transfecciones que utilizan ADN para el mutante doble de la transposasa piggyBac, "ILT", usando tanto un método de transfección basado en electroporación como un método de transfección basado en lípidos. La Figura 6 muestra los niveles de expresión del anticuerpo monoclonal procedente de células transfectadas con el mutante doble, "ILT", el ADN o el ARNm de la transposasa utilizando un método basado en electroporación o basado en lípidos. La Figura 6A muestra los resultados de la transfección usando la electroporación. La expresión mejoró, en comparación con el control de ADN, a medida que se aumentó la cantidad de ARNm. El mutante triple "LLT" proporcionó resultados similares, no se muestran los datos. La Figura 6B muestra los resultados de la transfección usando el método basado en lípidos. Los niveles de expresión del anticuerpo monoclonal fueron mejores, o al menos comparables con el control de ADN.

15 Los resultados de la versión sintética del ARNm se compararon con el ARNm que utiliza la electroporación. Ambas versiones tuvieron una expresión mayor que la del control que no se transfectó con una transposasa (-).

20 La Figura 7 muestra los niveles de expresión del anticuerpo monoclonal en asociación con la expresión del ADN de la transposasa mutante doble "ILT" y ambos combinados de ARNm transfectados procedentes de electroporación. Los combinados transfectados con ARNm sintético y ARNm tuvieron títulos similares a los combinados con el ADN basado en transposasa y títulos más altos que los combinados del control sin transposasa.

Análisis de la integración del gen de la transposasa a nivel del ADN del genoma

Se analizaron también la integración de los genes del mutante doble de la transposasa piggyBac, "ILT" y los genes del mutante triple "LLT" a nivel del ADN genómico. Se usaron los oligocebadores de los extremos 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos de la transposasa que se amplificó a un fragmento de ~ 1.7kb para comprobar si estaba presente la transposasa. Se extrajo el ADN genómico usando un Blood and Cell Culture DNA Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA) de aglomerados celulares recogidos en 1e7 células procedentes de líneas de células recuperadas transfectadas tanto con ARNm como con ADN. Se incluyó ADN plásmido como un control positivo. Se cuantificó el ADN genómico y se comprobó para la calidad ( $\geq 1.8$  era de buena calidad) mediante la relación de absorbancias a 260/280 usando un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher, Waltham, MA). Se llevó a cabo la amplificación mediante la PCR usando la polimerasa Q5 High Fidelity de New England Biolabs (Ipswich, MA) en un sistema de la PCR ProFlex (Life Technologies, Carlsburg, CA). La reacción se llevó a cabo en un gel de agarosa para la visualización.

#### Análisis de la integración del gen de la transposasa en el ADNc

Se analizaron también la integración de los genes del mutante doble de la transposasa piggyBac, "ILT" a nivel del transcrito. Se usaron de nuevo los oligocebadores descritos anteriormente para amplificar un fragmento de ~1.7kb para comprobar si estaba presente el transcrito de la transposasa en la célula. Se extrajo el ARNm usando un minikit RNeasy (Qiagen) de los aglomerados celulares recogidos 1e7 células de las líneas de células recuperadas transfectadas con la adición tanto de ARNm como de ADN de la transposasa. Se incluyó ADN plásmido como control. Se cuantificó el ARNm y se comprobó para determinar la calidad mediante la relación de la absorbancia a 260/280 usando un espectrofotómetro NanoDrop. Se comprobó la transposasa a nivel de transcrito usando un Sistema SuperScript III One-Step RT-PCR con ADN Polimerasa Platinum *Taq* High Fidelity (ThermoFisher) que lleva a cabo la síntesis del ADNc y la posterior amplificación de la secuencia diana (es decir, la transposasa) en un sistema ProFlex PCR (Life Technologies) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un gel de agarosa para la visualización.

Los combinados de líneas de células transfectadas con ADN y ARNm se comprobaron para la integración a nivel genómico y a nivel del transcrito. Figura 8. Una banda a ~1.7 kb indica la presencia de la transposasa en el genoma de la línea de células. Figura 8A. Todos los combinados de líneas de células transfectadas con el ADN de transposasa mutante doble "ILT" mostraron integración a nivel del transcrito, mientras que las transfectadas con ARNm no mostraron integración a los niveles genómico y de transcrito. Figura 8B.

#### Ensayo de ddPCR para el número de copias

Para ensayar el número de copias, se extrajo el ADN genómico de  $5 \times 10^6$  células de cada clon y se combinaron usando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Se llevó a cabo la PCR digital de gotículas usando el kit ddPCR Supermix for Probes (sin dUTP) (Bio-Rad). Cada reacción contenía 1 unidad de HindIII, 10 ng de ADN del molde, así como 900 nm de cebadores directos e inversos y 250 nm de sonda fluorescente diseñada hacia la secuencia de codificación del mutante doble diana "ILT" y el gen de referencia endógeno de CHO, Gcg. Se generaron gotículas usando el sistema AutoDG (Bio-Rad) y se llevó a cabo la amplificación mediante la PCR en un sistema ProFlex PCR (Life Technologies) con las condiciones de ciclación térmica de 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 30 s y 60°C durante 1 min, a continuación 98°C durante 10 min. Se leyeron las gotículas en un sistema QX200 Droplet Reader (Bio-Rad), y se llevó a cabo el análisis de los datos del número de copias usando el software Quantasoft (Bio-Rad).

Para determinar si todos los clones en un combinado tenían la transposasa integrada, los combinados transfectados con ADN de transposasa eran células sencillas clonadas y comprobadas para la integración a nivel del ADN genómico (ADNg). Se evaluaron también el combinado y los clones para el número de copias de la transposasa usando la ddPCR.

El combinado tenía un bajo número de copias y contenía clones que no mostraron integración de la transposasa. Se identificaron los clones sin integración de la transposasa cribando clones utilizando un método basado en la PCR, como se describe anteriormente. Los clones sin transposasa integrada estuvieron presentes en la población de combinados. Figura 9.

#### Ejemplo 4 Generación de linfocitos T-TCR utilizando una transposasa piggyBac

Se usó la transposasa piggyBac mutada doble "ILT" para modificar de forma satisfactoria los linfocitos T primarios para expresar un receptor de linfocitos T (TCR), Figura 10A. Los linfocitos T-TCR generados a partir de PiggyBac presentaron una sólida destrucción de la diana así como una proliferación específica de antígenos (Figuras 10 B y 10 C).

Se aislaron en primer lugar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de leucopaks de donantes sanos mediante separación de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Chicago, IL), y se aislaron posteriormente linfocitos T de PBMC usando el EasySep Human T cell Isolation Kit (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá). A continuación se activaron los linfocitos T y dos días después de la activación, los linfocitos T se coelectroporaron con un plásmido que comprendía los elementos de repeticiones terminales invertidas en 5' y 3' de un transposón piggyBac que comprendía los genes que codificaban TCR-IRES-EGFP y el ARNm que codificaba la transposasa mutante doble "ILT", (SEQ ID NO:18), usando el sistema 4-D Nucleofector (Lonza, Greenwood, SC). Se suplementaron las células con citoquina IL2 cada 2-3 días.

## ES 2 991 895 T3

### Determinación de la integración de TCR

- 5 En el día 7 después de la activación, se evaluaron los linfocitos T para la expresión de TCR y el fenotipo celular mediante la tinción superficial de células con el anticuerpo dextrámero (Immudex, Copenhague, Dinamarca) que reconoce TCR, así como los anticuerpos conjugados con el fluoróforo CD3, CD4, y CD8 (Biolegend, San Diego, CA). Se analizaron las muestras para determinar la expresión analizándolas en el citómetro de flujo BD LSRII.

### Ensayos funcionales

Se contaron los linfocitos T y se recogieron para los ensayos funcionales en el día 9-14 después de la activación.

### Ensayo de lisis y proliferación celular

- 10 Linfocitos T teñidos con 1E5 CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) se coincubaron con 5e4 células diana en 150  $\mu$ L de medio en una placa de fondo en U de 96 pocillos durante 5 días. La lisis de las células diana y la proliferación de linfocitos T se evaluaron mediante dilución del CellTrace Violet se cuantificaron analizando las muestras en el citómetro de flujo BD LSRFortessa (Liberty Lake, WA).

**REIVINDICACIONES**

1. Una transposasa piggyBac:
  - (i) que comprende una sustitución de leucina por isoleucina en la posición 147 de SEQ ID NO: 2, una sustitución de leucina por isoleucina en la posición 247 de SEQ ID NO: 2, y una sustitución de treonina por serina en la posición 533 de SEQ ID NO: 2; y/o
  - (ii) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16.
2. Una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1, opcionalmente en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona de ADN o ARNm.
3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 2.
4. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 3, que comprende además al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, opcionalmente en el que el vector comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican una o más proteínas de interés.
5. Una célula transfectada con un vector según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética según la reivindicación 2.
6. La célula según la reivindicación 5, en la que la célula es: (i) una célula hospedadora; (ii) una célula CHO; o (iii) una célula inmunitaria.
7. La célula según la reivindicación 5:
  - (i) cotransfectada con una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 2, y un vector que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac;
  - (ii) cotransfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 3, y un vector que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac; o
  - (iii) cotransfectada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 3 y que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac;

en la que opcionalmente el título de una proteína de interés expresada por la célula transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética está mejorado en comparación con el título de la misma proteína de interés expresada por una célula transfectada con una transposasa piggyBac natural o sin transposasa piggyBac.
8. La célula según la reivindicación 7, en la que la proteína de interés es una proteína de unión a antígeno, opcionalmente en la que la proteína de unión a antígeno se selecciona de un receptor de linfocitos T, un acoplador de linfocitos T biespecífico, un hetero Fc acoplador de linfocitos T biespecífico, una proteína de fusión, una IgG-scFv, o un anticuerpo monoclonal.
9. Un método para mejorar el título de una proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora, que comprende
  - modificar por ingeniería genética una molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora;
  - cotransfectar la célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica la transposasa piggyBac y con un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac; y
  - cultivar las células para expresar la proteína recombinante de interés,

en el que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética está mejorado en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por una célula hospedadora transfectada con una transposasa piggyBac natural o sin transposasa piggyBac.

5 10. Un método para aumentar la producción de proteína recombinante en un cultivo de células de mamífero que expresa una proteína recombinante, que comprende

10 establecer un cultivo celular en un biorreactor que utiliza una célula hospedadora que se ha cotransfectado con una molécula de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida de un transposón piggyBac; y

expresar la proteína recombinante de interés;

15 en el que el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética está mejorado en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con una transposasa piggyBac natural o sin transposasa piggyBac.

11. Un método para producir una proteína recombinante aislada, purificada, de interés, que comprende

20 establecer un cultivo celular en un biorreactor con una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante de interés, en el que la línea celular se ha cotransfectado con una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora, y un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac;

cultivar las células para expresar la proteína recombinante de interés;

25 cosechar la proteína recombinante de interés,

procesar la proteína recombinante de interés a través de una o más operaciones unitarias, y

obtener una proteína recombinante aislada, purificada, de interés.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que:

30 (i) la célula hospedadora se transfecta con un primer vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica la transposasa piggyBac y un segundo vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac; o

35 (ii) la célula hospedadora se transfecta con un único vector que comprende la molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética que codifica la transposasa piggyBac y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac.

13. El método según la reivindicación 11, en el que:

40 (i) al menos una operación unitaria es una etapa de cromatografía de captura seleccionada de cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía multimodal, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxipatita;

(ii) al menos una operación unitaria es una etapa de cromatografía de pulido seleccionada de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía multimodal, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxipatita;

45 (iii) al menos una operación unitaria se selecciona de inactivación de virus, filtración de virus, filtración de profundidad, y UF/DF; o

50 (iv) el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con la transposasa piggyBac modificada por ingeniería genética se mejora en comparación con el título de la proteína recombinante de interés expresada por la célula hospedadora transfectada con una transposasa piggyBac natural o sin transposasa piggyBac.

14. Un kit para transfectar una célula, que comprende

una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en la célula hospedadora; y

5 un vector que comprende al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac en el que se inserta al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés.

15. Un método para generar células modificadas genéticamente no virales, que comprende:

(a) establecer un vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac;

10 (b) proporcionar células inmunitarias nativas aisladas de un donante o sujeto;

(c) transfectar las células con el vector y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula y;

15 (d) expandir las células por cultivo celular en una población mayor de células modificadas genéticamente, no virales.

16. Un método según la reivindicación 15, en el que:

(i) las células se transfectan con el vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula; o

20 (ii) las células se transfectan con un vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula.

17. Una célula modificada genéticamente no viral para uso en un método para tratar a un sujeto, en la que el método comprende:

(a) establecer un vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac;

30 (b) aislar células inmunitarias nativas de un sujeto o donante;

(c) transfectar las células con el vector y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula;

35 (d) expandir las células por cultivo celular en una población mayor de células modificadas genéticamente;

(e) aislar las células transformadas del cultivo celular para obtener una población celular que comprende las células modificadas genéticamente; y

(f) reintroducir en el sujeto las células modificadas genéticamente no virales.

18. La célula modificada genéticamente no viral para su uso según la reivindicación 17, en la que:

(i) las células se transfectan con el vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula; o

40 (ii) las células se transfectan con un vector que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de interés flanqueada por al menos los elementos de repetición invertida 5' y 3' de un transposón piggyBac, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa piggyBac según la reivindicación 1 modificada por ingeniería genética para aumentar la estabilidad en una célula.

19. La célula modificada genéticamente no viral para uso según la reivindicación 17, en la que:

(i) la célula inmune nativa es una célula mononuclear;

(ii) la célula inmune nativa es una célula T;

5

(iii) al menos una proteína de interés es un receptor de antígeno, un receptor de células T, o un receptor de antígeno quimérico; o

(iv) la célula también se transfecta con una molécula de ácido nucleico que codifica un gen suicida, un interruptor inducible o acelerador, o ambos.

10

20. Una célula modificada genéticamente para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un donante o sujeto que lo necesita, que comprende administrar al donante o sujeto una cantidad eficaz de la célula modificada genéticamente, en la que la célula modificada genéticamente es una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8.

FIG. 1

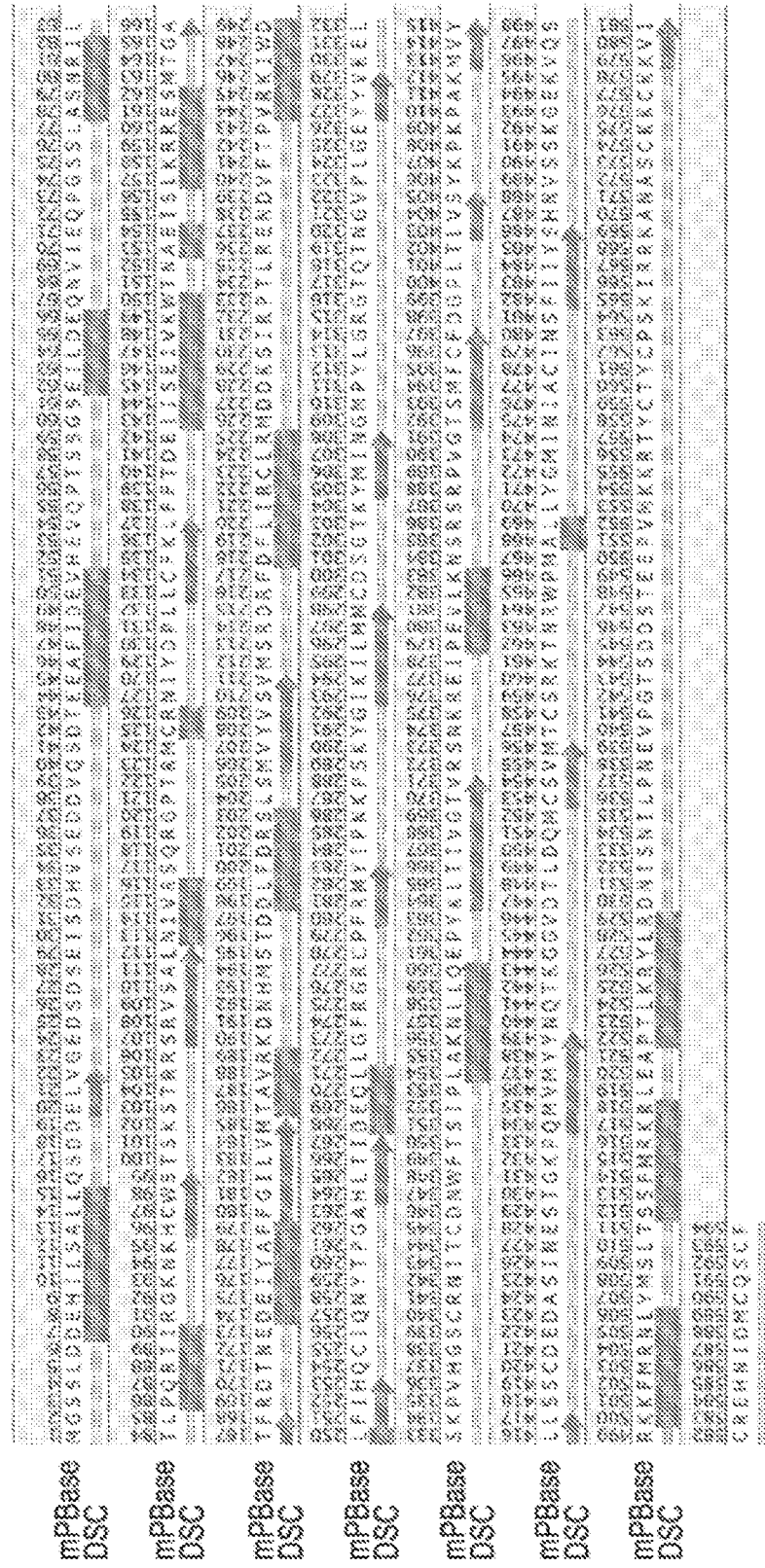


FIG. 2

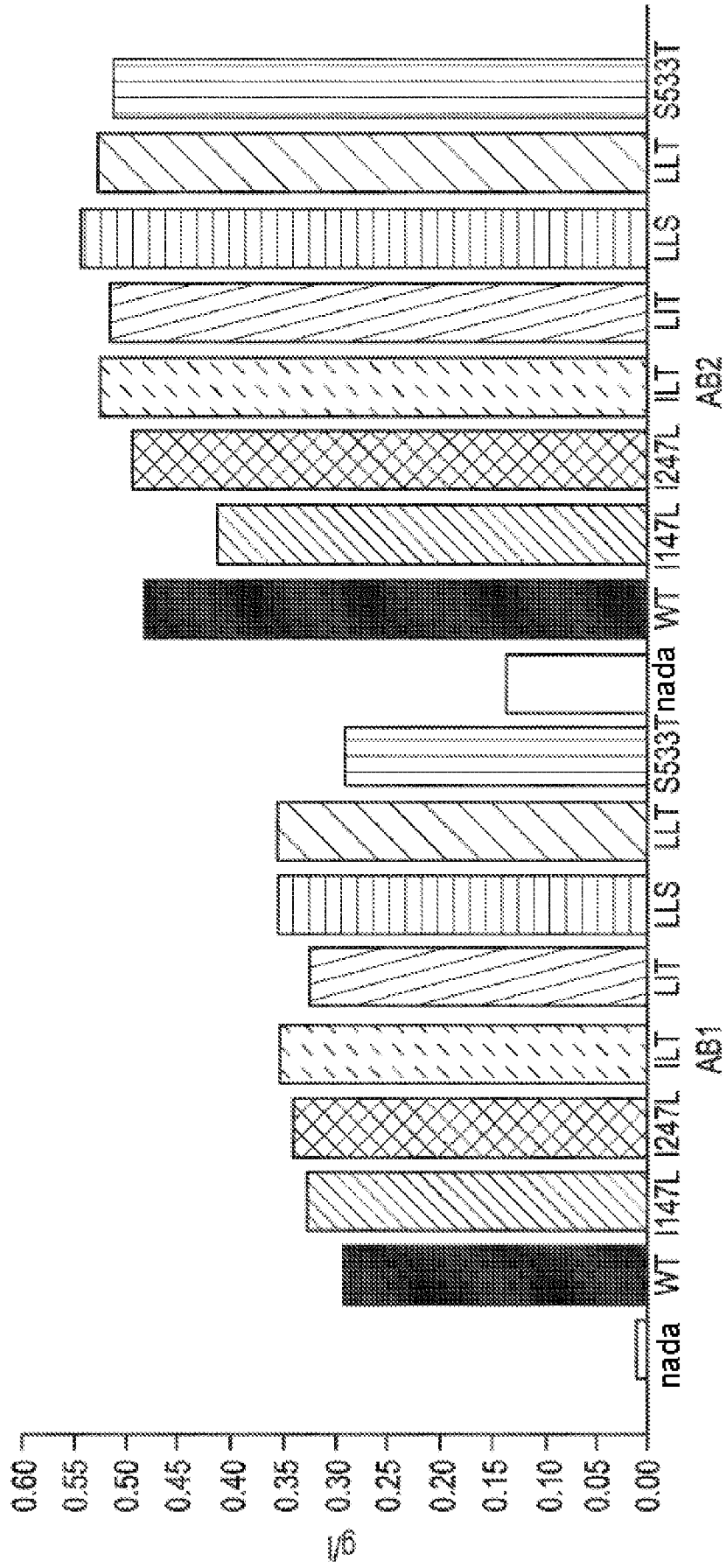


FIG. 3

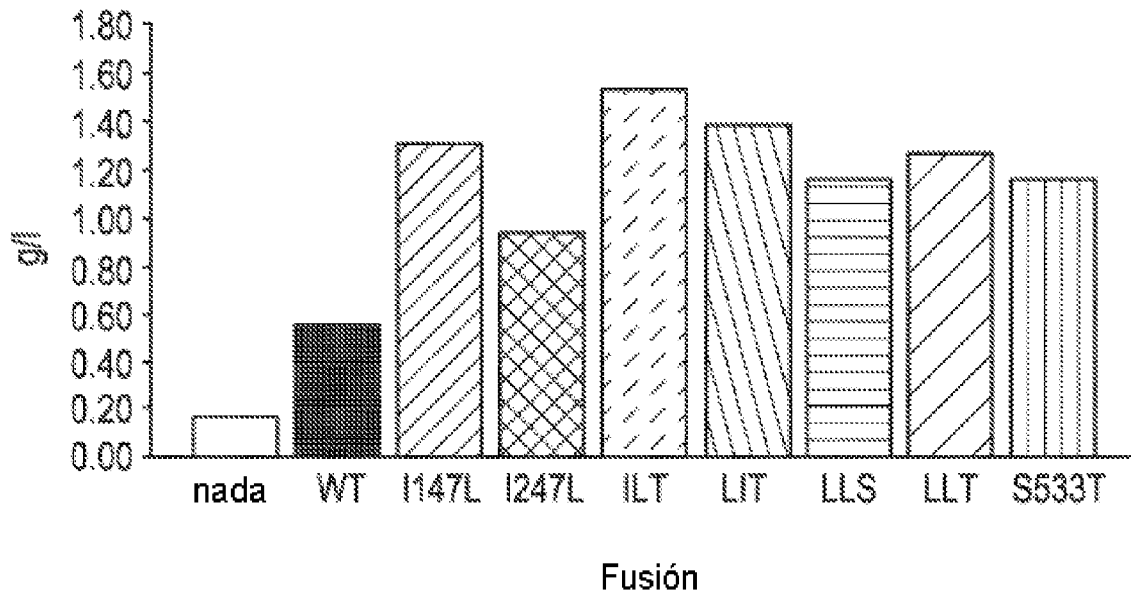


FIG. 4

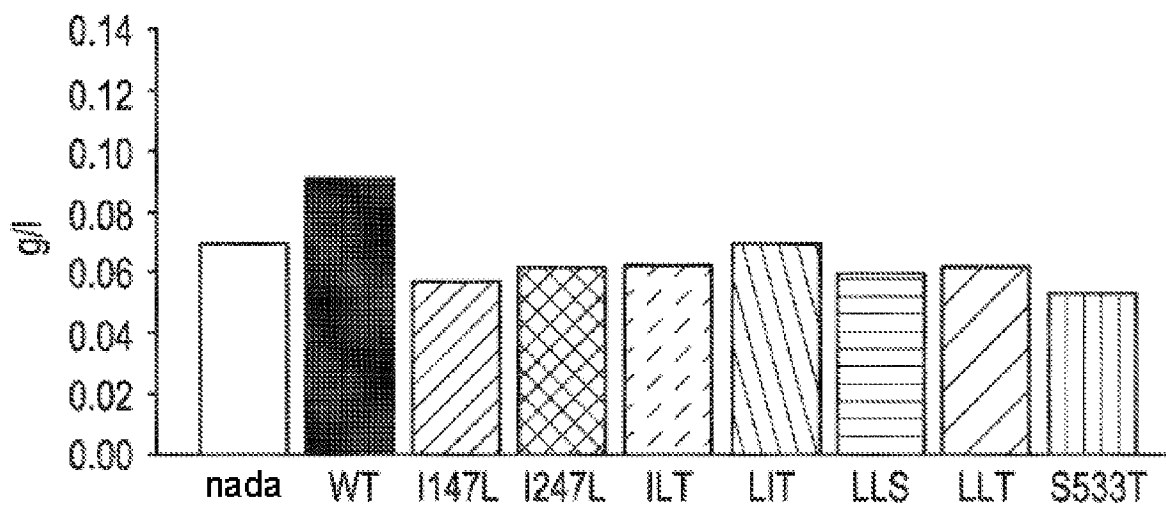


FIG. 5

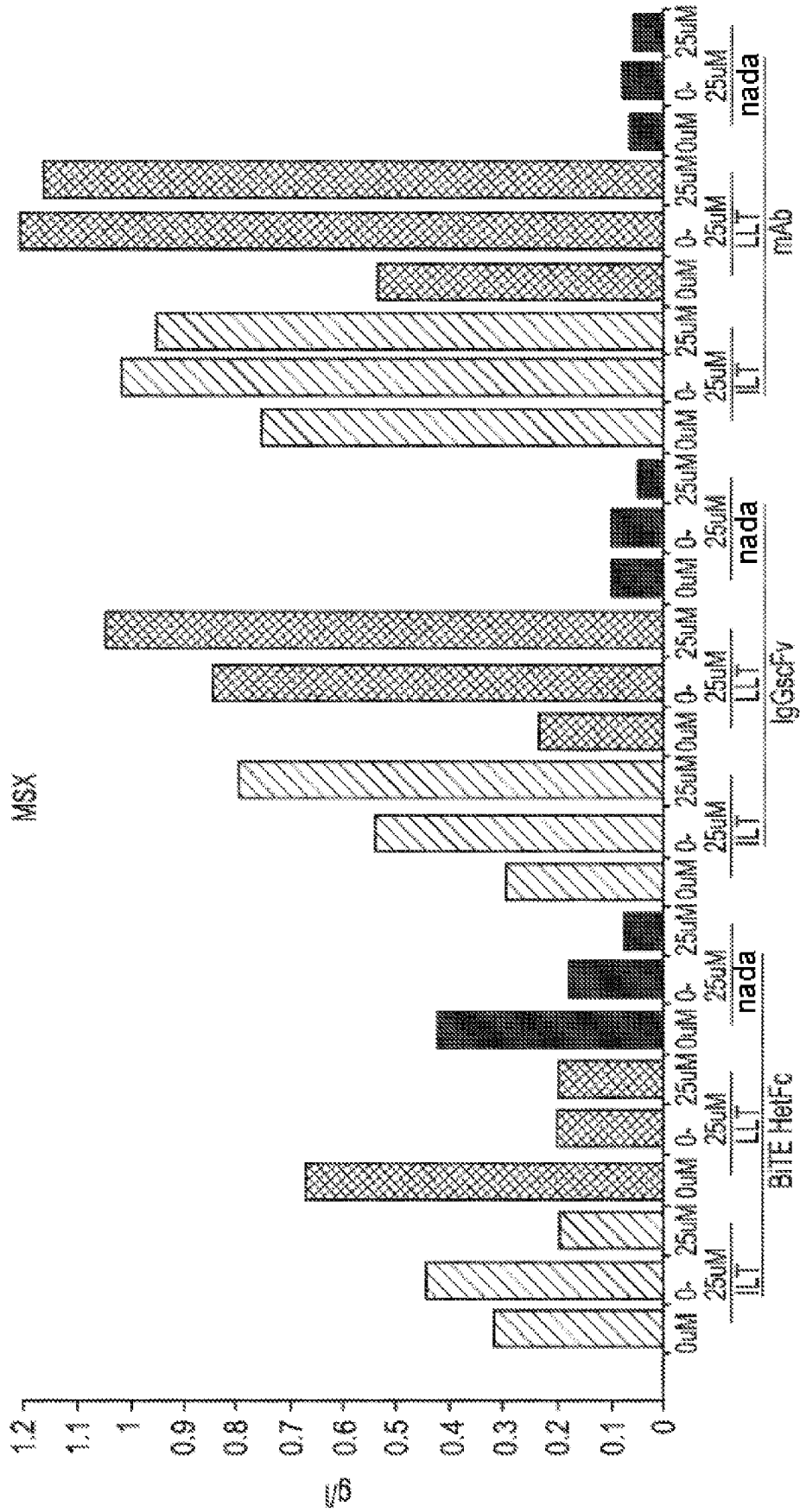


FIG. 6A

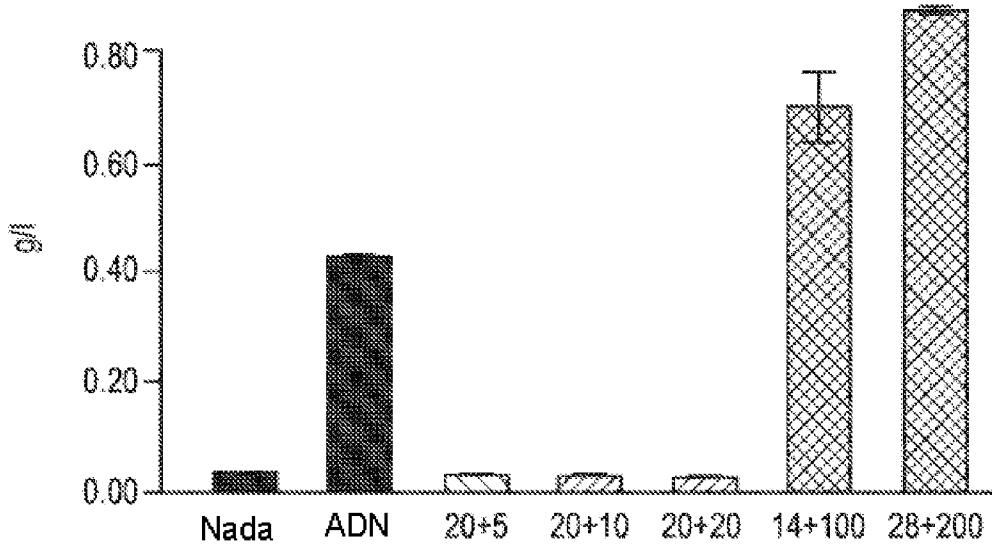


FIG. 6B

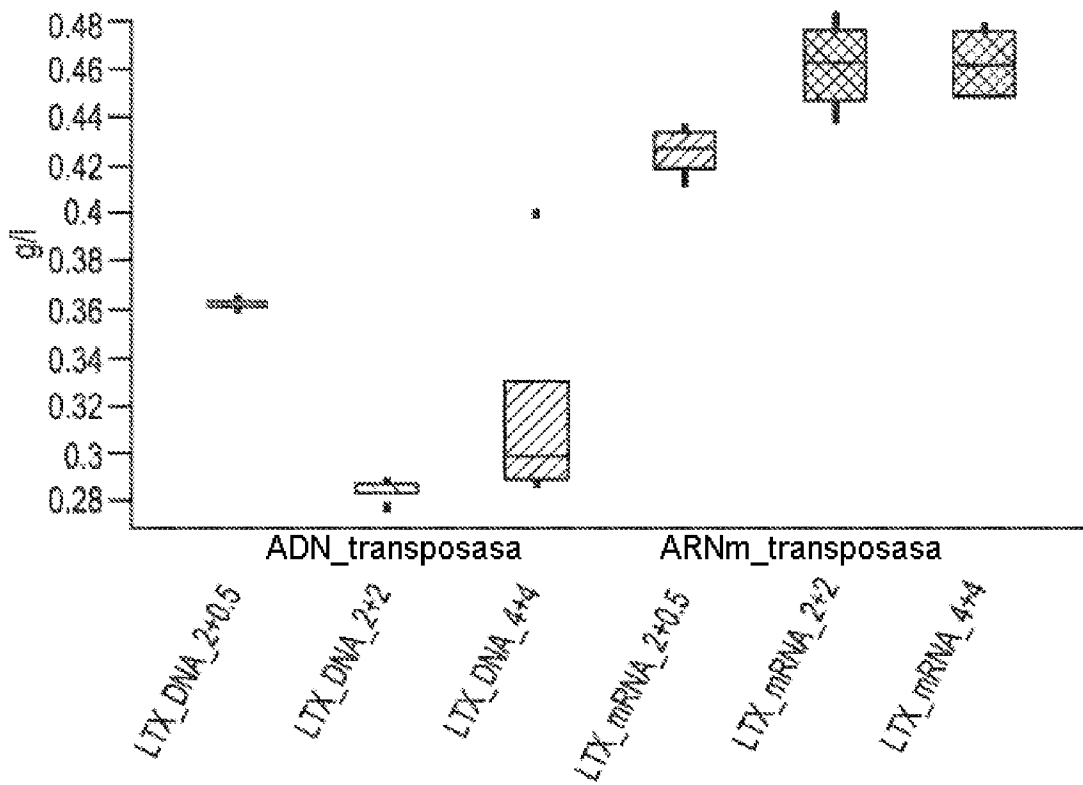


FIG. 7

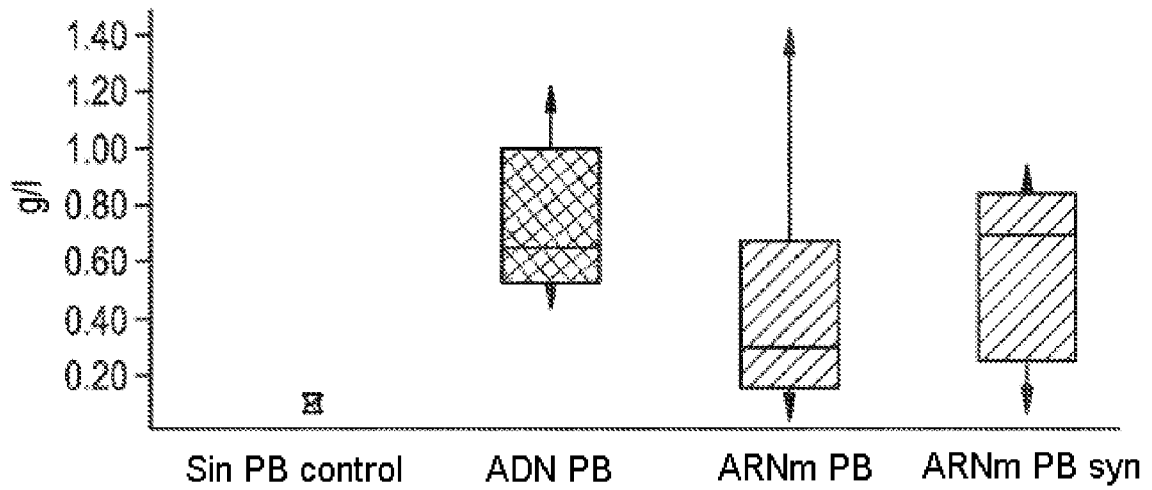


FIG. 8A

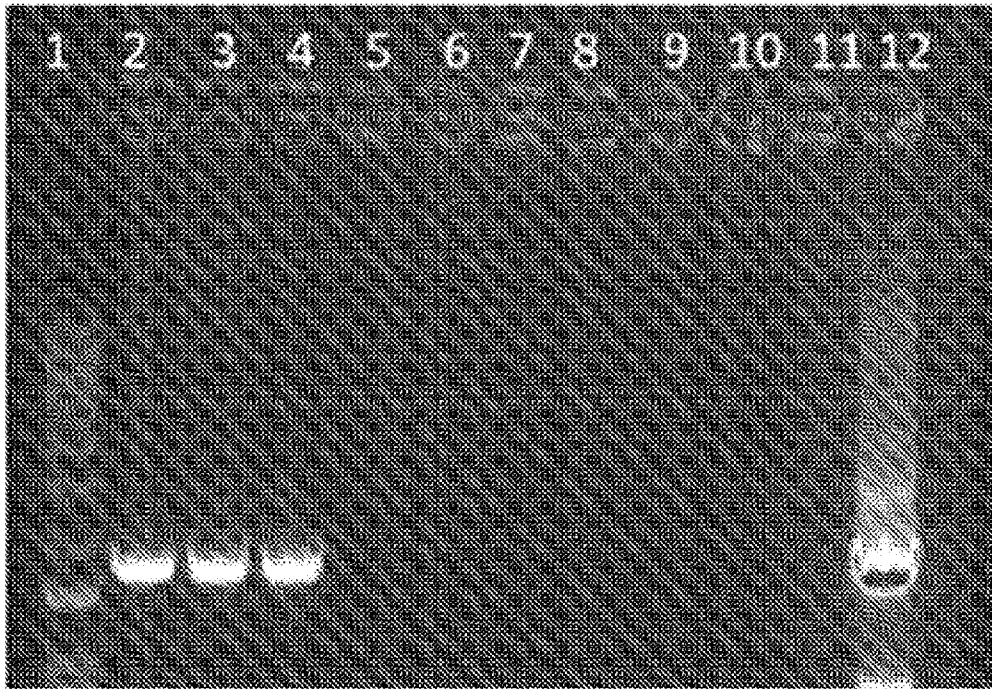


FIG. 8B

RT-PCR

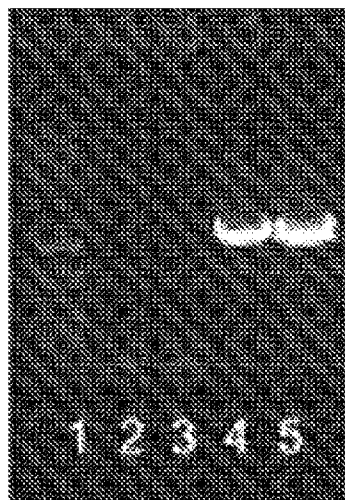


FIG. 9

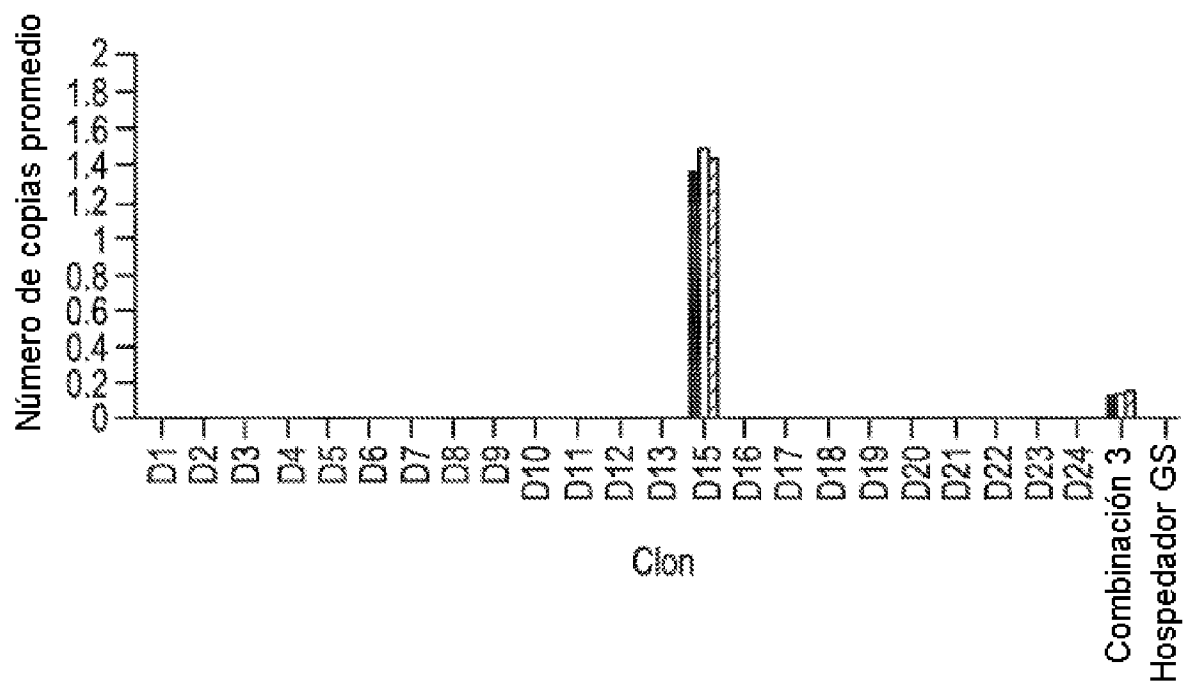


FIG. 10A

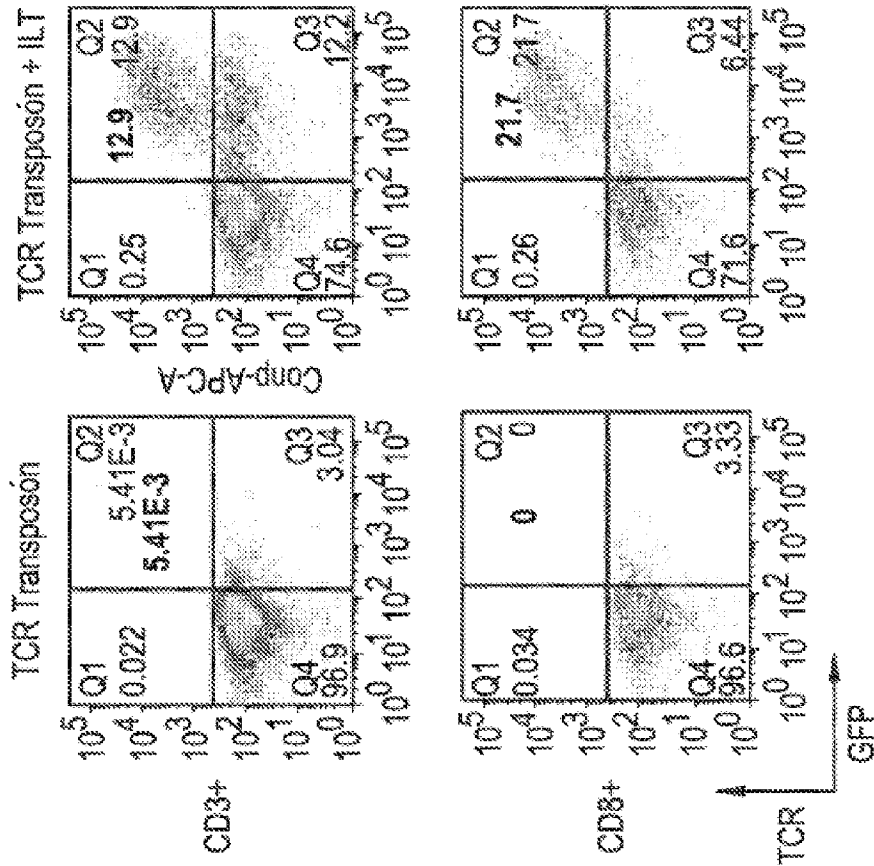


FIG. 10B

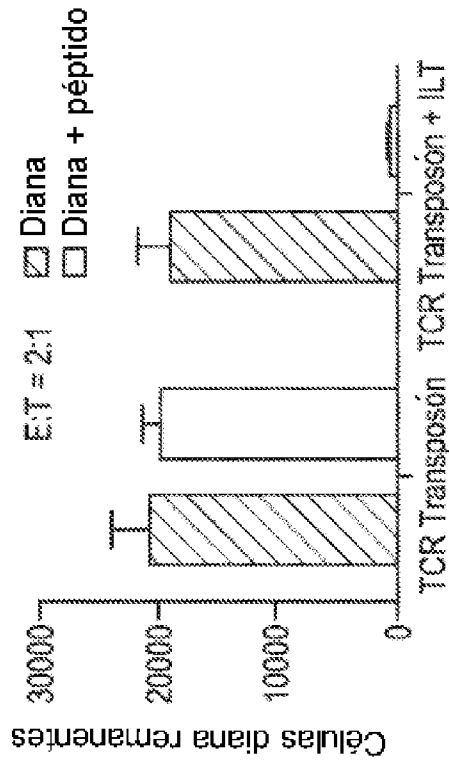


FIG. 10C

